UNIVERSITE DE MONTPELLIER. — FACULTE DE PHARMACIE

N° 124

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

DE LA

PEPSINE

THÈSE

Presentee et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

Le Janvier 1922

PAR

E. RENAUD

PHARMACIEN DE 1re CLASSE

LAURÉAT DE L'ÉCOLE DE PHARMACIE DE NANTES

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université de Montpellier (Mention Pharmacie)

JURY : MM. ASTRUC, Professeur, *Président*.
TARBOURIECH, Professeur.
CANALS, chargé d'agrégation. } *Assesseurs*.

MONTPELLIER
IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE
Rue Ferdinand-Fabre et Quai du Verdanson
1922

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

DE LA

PEPSINE

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER. — FACULTE DE PHARMACIE N° 124

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

DE LA

PEPSINE

THÈSE

Presentée et publiquement soutenue devant la Faculté de Pharmacie de Montpellier

Le Janvier 1922

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

PAR

E. RENAUD

PHARMACIEN DE 1re CLASSE

LAURÉAT DE L'ÉCOLE DE PHARMACIE DE NANTES

Pour obtenir le Diplôme de Docteur de l'Université de Montpellier (Mention Pharmacie)

JURY : MM. ASTRUC, Professeur, *Président.*
TARBOURIECH, Professeur. } *Assesseurs.*
CANALS, chargé d'agrégation. }

MONTPELLIER
IMPRIMERIE FIRMIN ET MONTANE
Rue Ferdinand-Fabre et Quai du Verdanson
1922

Faculté de Pharmacie de Montpellier

ADMINISTRATION

MM.	G. MASSOL (✻, I. P. ✪) . . .	*Doyen.*
	FONZES-DIACON (✻, I. P. ✪).	*Assesseur.*
	N.	*Secrétaire.*
	GOT (I. P. ✪) et IZARD (I. P. ✪)	*Secrétaires honoraires.*

PROFESSEURS

MM.	L. COURCHET (I. P. ✪). . . .	*Histoire naturelle des médicaments. Botanique.*
	G. MASSOL (✻, I. P. ✪) . . .	*Physique appliquée.*
	C. ASTRE (I. P. ✪)	*Chimie organique.*
	H. IMBERT (I. P. ✪)	*Analyse chimique.*
	H. FONZES-DIACON (✻, I. P. ✪)	*Chimie minérale.*
	A. ASTRUC (I. P. ✪)	*Pharmacie galénique et industrielle.*
	P.-J. TARBOURIECH (✻, I. P. ✪)	*Pharmacie chimique.*
	A. JUILLET (I. P. ✪)	*Matière médicale.*

PROFESSEUR HONORAIRE

M. F. JADIN (I. P. ✪), doyen de la Faculté de Pharmacie de Strasbourg

CHARGÉS DE COURS

MM.	H. IMBERT (I. P. ✪).	*Toxicologie.*
	A. ASTRUC (I. P. ✪)	*Hydrologie.*
	P.-J. TARBOURIECH (✻, I P ✪)	*Chimie biologique.*
	M.-A. FAUCON (✻, A. ✪). .	*Fonctions en chimie organique.*
	E. CANALS	*Botanique cryptogamique.*
	M. EMBERGER	*Zoologie pharmaceutique.*
	MOYE, prof Fac. Droit (I. P. ✪)	*Législation pharmaceutique.*

AGRÉGÉS

MM. M.-A. FAUCON (✻, A. ✪).
E. CANALS, chargé d'agrégation.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM.	M.-A. FAUCON (✻, A. ✪) . .	*Physique.*
	L. FARRÉ (A. ✪)	*Chimie et Pharmacie.*
	E. DALMIER.	*Histoire naturelle.*

NOTA. — La Faculté de Pharmacie n'accepte la responsabilité d'aucune des opinions émises par les candidats dans les Thèses ou Synthèses qui lui sont présentées.

A F. RABELAIS

E. RENAUD.

A MON PRÉSIDENT DE THÈSE

MONSIEUR LE PROFESSEUR ASTRUC

A MONSIEUR LE PROFESSEUR TARBOURIECH

CHEVALIER DE LA LÉGION D'HONNEUR

A MONSIEUR CANALS

DOCTEUR ÈS-SCIENCES

CHARGÉ D'AGRÉGATION

E. RENAUD.

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 11

PREMIÈRE PARTIE

QUELQUES DONNÉES GÉNÉRALES SUR LA PEPSINE

Définition 15
Localisation 15
Nature de la pepsine 16
Nature de l'action de la pepsine 18
Matière passive : *Etude résumée des albuminoïdes* 22
Travail chimique de la pepsine 24
Mesure de l'activité de la pepsine 25

DEUXIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — PROCÉDÉ DU CODEX FRANÇAIS 29

Technique 29
Eau, acidité, température, temps 30
Critique 32
La fibrine 34
Complément du procédé Codex : Méthode Sorensen 39
Théorie 40
Technique 41

Pages

CHAPITRE II. — Procédés des Pharmacopées étrangères. 43

Procédé allemand..... 45

Procédé belge..... 45

Critiques..... 45

Procédé au blanc d'œuf desséché..... 49

CHAPITRE III. — Procédé de dosage a l'édestine..... 51

L'édestine..... 52

Propriétés et caractères..... 53

Modes opératoires des dosages..... 53

Procédé Fuld..... 54

Procédé américain..... 55

Procédé de Bailly..... 57

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER. — Sortes commerciales de pepsines. — Procédé industriel de fabrication..... 61

CHAPITRE II. — Quelques incompatibilités de la pepsine. 66

Action du chloroforme sur la pepsine..... 68

1° *Action du chloroforme pur sur la pepsine*..... 68

2° *Action des vapeurs de chloroforme sur la pepsine*..... 71

3° *Action de l'eau chloroformée sur la pepsine* 71

4° *Action de l'eau chloroformée sur la digestion in vitro*..... 72

Action de l'alcool sur l'activité pepsique..... 74

1° *Action de l'alcool à 95° sur la pepsine*..... 75

2° *Action des alcools faibles sur la pepsine*..... 77

3° *Action des alcools faibles sur la digestion in vitro*..... 78

Pages

Action du tanin..... 79

1° *Action du tanin sur la pepsine*..... 79

2° *Action du tanin sur la digestion in vitro*..... 80

Conclusions 82

Bibliographie..... 85

ÉTUDE PHARMACOLOGIQUE

DE LA

PEPSINE

INTRODUCTION

La chimie biologique est une science neuve, remplie d'inconnu et d'incertitude, forêt vierge qui tente les explorateurs. Elle est percée de quelques routes et de beaucoup de sentiers inachevés. C'est la science intime du vivant, de la nature, si bien que la découverte des diastases, sembla, pour Claude Bernard (1), contenir « le secret de la vie ». Mais, la nature est une femme voilée, coquette et capricieuse, on croit pénétrer dans son intimité, elle s'enfuit et vous laisse dans la main un bout de ruban inutile. Ceux qui l'aiment doivent être rusés, courageux et tenaces, et ne pas laisser échapper ses faveurs fugitives. Le *varium et mutabile* de Virgile s'applique très bien aux phénomènes biologiques qui sont « un éternel devenir », un éternel mouvement.

Dans l'étude que nous allons entreprendre, nous trou-

(1) Bernard (Claude). Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux, t. I, p. 160, 1878-1879.

vons partout l'inconnu. Inconnue la nature de la pepsine! Entité pour les uns; propriété, puissance, pour d'autres. Hypothèse, le mode d'action des diastases ? Hypothèse, l'action catalytique!

Nous avons essayé dans le premier chapitre de résumer les données les plus précises de la science, sur la nature, le mode d'action, le travail chimique de la pepsine.

Le travail de la pepsine a donné lieu à des recherches et à des procédés de titrage d'activité. Ce sont ces méthodes, les principales, que nous examinerons et discuterons dans un deuxième chapitre. En étudiant le procédé français, nous avons cherché à l'améliorer par des essais de stabilisation des fibrines; ces essais n'ont point répondu à notre espoir et nous exposons loyalement nos déceptions.

De plus, la pepsine étant entrée dans la thérapeutique, nous avons cru bon de rappeler son mode de fabrication industrielle, avant de citer ses différentes sortes commerciales, puis nous terminons ce troisième chapitre, par l'étude méthodique de trois corps regardés comme incompatibles avec la pepsine: chloroforme, alcool et tanin.

En venant à Montpellier préparer une thèse, nous avions pensé à un sujet de chimie biologique. M. le professeur Astruc nous reçut alors avec une amabilité que nous n'oublierons pas. Il nous conseilla de reprendre l'étude des dosages et de quelques incompatibilités de la pepsine et nous accueillit dans son laboratoire. Avec sa haute compétence, il nous suscita les recherches à faire et la voie à suivre.

M. Canals, docteur ès sciences, agrégé de pharmacie, passionné de chimie biologique, ne nous refusa jamais un bon conseil et un encouragement.

En juillet, nous sollicitions de M. Byla la faveur de passer quelques temps dans son laboratoire. Où pouvions-nous mieux nous adresser pour nous documenter sur la pepsine? Les Etablissements de Gentilly sont une des plus importantes fabriques de produits opothérapiques. M. Byla, avec sa haute science et sa grande expérience a su adapter et modifier ses laboratoires suivant les découvertes et les progrès de la chimie biologique.

Nous gardons un excellent souvenir des quelques semaines passées à Gentilly. M. Pénau, docteur ès sciences, directeur technique des Etablissements de Gentilly, nous reçut en confrère et même en ami. Malgré un travail excessif, il ne négligeait rien de ce qui pouvait nous intéresser et nous être utile. Nous lui en gardons une profonde reconnaissance.

Mlle G. Dubois, charmante et distinguée chimiste, nous accueillit au laboratoire avec une gentillesse que nous n'oublierons point. Elle nous prodigua ses conseils et ne se plaignit jamais du supplément de travail que nous lui donnions souvent.

Nous remercions également M. Simonet, vétérinaire, des excellents conseils qu'il nous donna; MM. Briand et Bonjean.

Nous ne terminerons point sans dire tout ce que nous devons à notre frère. Officier d'infanterie durant toute la guerre, il eut ensuite le courage de mener à bien ses études de pharmacie. C'est grâce à lui que nous avons pu entreprendre ce travail, il nous a remplacé pendant les longs mois que nous ont demandé cette étude.

Enfin, puisque toute thèse, suivant la tradition, doit avoir une dédicace, cette dédicace sera pour Rabelais, un de nos auteurs préférés. Il a décrit d'une façon unique l'euphorie d'une bonne digestion. L'estomac de son Gar-

gantua devait secréter un ferment d'une singulière activité. Rabelais a synthétisé le bien vivre, la vieille gaieté française de tous ceux qui ont un estomac puissant et savent apprécier une bonne table :

Le mal temps passe et retourne le bon
Pendant qu'on trinque autour d'un gras jambon (1).

(1) Rabelais. *Pantagruel,* chapitre LXV.

PREMIÈRE PARTIE

QUELQUES DONNEES GENERALES SUR LA PEPSINE

Définition. — La pepsine est un ferment (diastase, enzyme ou zymase) qui a la propriété en milieu acide d'hydrolyser les albuminoïdes.

Ce ferment est, suivant les uns: Langley (1), Podwissotski (2), Glassner (3), un complexe dérivé d'un proferment (propepsine); suivant d'autres, Duclaux, Achalme, la prodiastase ne serait que la diastase attendant pour agir l'intervention d'une cause extérieure (diastase en puissance).

Localisation. — La pepsine existe surtout dans l'estomac des vertébrés; on la trouve aussi dans certains liquides organiques: lait — dans les muscles — dans quelques cultures microbiennes.

Si l'on ouvre un estomac de porc, par exemple, on distingue quatre couches anatomiques: muqueuse, sous-muqueuse, musculaire et péritonéale; la couche muqueuse seule nous intéresse puisqu'elle renferme toutes les glan-

(1) Langley. On the hystology of the mammaliangastric glands and the relation of pepsin to the granules of the chief cells. *J. of Physiolog.*, III, 269, 1881.

Langley et Edkins. Pepsin and pepsinogen. *J. of Physiol.*, VII, 371, 1886.

(2) Podwissotski. *Plüg. Arch.*, XXXIX, 62.

(3) Glassner. Uber die Vorstufen der Magenfermente. *Hofm. Beitr.*, t. I, 1901.

des à sécrétion utile et est à peu près la seule employée en opothérapie. Au point de vue fonctionnel, on distingue sur cette muqueuse trois régions: celle du cardia qui fait suite à l'œsophage, celle du fond: région fundique ou de la grande courbure, très riche en glandes digestives; enfin, la région pylorique, riche surtout en glandes à mucus.

Expérimentalement, il est facile de reconnaître la valeur sécrétrice de ces régions. Pour ce, après séchage de la muqueuse stomacale à l'étuve à 45°, on la découpe en lanières correspondant aux différentes parties (cardia, fond et pylore). Chacune de ces parties est broyée, séparément, tarée et mise en présence de fibrine et de HCl dans des flacons au bain-marie à 50°.

Nous avons, après expériences, trouvé les résultats suivants:

Parties Fundiques			Parties Pyloriques et Périphériques		
Essai aux titres	Touche azotique	Heures	Essai aux titres	Touche azotique	Heures
50	—	6	50	—	6
100	—	6	100	+	6
150	+	6	150	+	6
200	+ (1)	6	200	+	6

Les parties fundiques donnaient donc, après 6 heures une digestion complète au T 100, la touche azotique étant négative à ce titre tandis qu'elle était positive pour les régions périphériques au-dessus du T 50.

Nature. — La nature de la pepsine est peu connue: elle n'a d'ailleurs jamais été isolée à l'état pur. Tout ce qu'on peut affirmer, c'est que la pepsine est un complexe albuminoïdique à l'état colloïdal avec toutes les propriétés de cet état. Elle ne doit ni dialyser, ni diffuser, être visible

(1) Le signe — touche azotique négative, indique une digestion finie. Le signe + indique une digestion incomplète.

à l'ultramicroscope, présenter les phénomènes des mouvements browniens, de cataphorèse, d'adsorption (ou adhésivité), de floculation et de coagulation.

Trois de ces propriétés sont particulièrement intéressantes en ce qui regarde la pepsine.

Ce sont: l'*adsorption*, la *cataphorèse*, la *floculation* et *coagulation*.

On entend par *adsorption*, la propriété que possèdent les granulations colloïdales de fixer à leur surface certaines substances ambiantes qu'elles imprégnent énergiquement. Suivant les uns: Van Bemmelen (1), Knecht (2), Suida (3), l'adsorption est un phénomène chimique; selon d'autres, l'adsorption ne suivant pas la loi des proportions définies serait un phénomène capillaire et même électro-capillaire, dû à l'électrisation de contact (Jean Perrin (4), Bayliss (5), Grumbach (6).

De plus, l'adsorption de ces granulations colloïdales est presque toujours nettement spécifique, les unes fixant des substances basiques, les autres des substances acides. Quelques-unes cependant sont indifférentes. Ces propriétés sont faciles à constater expérimentalement à l'aide des matières colorantes: c'est ainsi que la silice fixe les

---

(1) Van Bemmelen. *Zeitschrift f. prakt. Chem.*, 1881, t. 23, p. 324 et 379; — *Zeitschr. f. anorg. Chem.*, 1900, t. 23, p. 111, 321; 1903, t. 36, p. 380; — *Zeitschr. f. Physik. Chem.*, 1895, t. 18, p. 331.

(2) Knecht. *Ber. d. Deutsch. Chem. Gesell.*, 1888.

(3) Suida. *Monatschefte f. Chem. Wien.*, 1904; Académie des sc. de Vienne, 1905, t. 114.

(4) Perrin (Jean). *Journ. de chimie physique*, 1904, t. 2, p. 601, et 1905, t. 3, p. 50.

(5) Bayliss. *Biochem. Journ.*, t. I.

(6) Grumbach. Thèse Faculté sciences, Paris, 1911.

substances basiques et Al^2O^3 les substances acides. L'albumine, importante pour nous au sujet des dosages de pepsine, a un caractère amphotère ou indifférent, adsorbant bases ou acides. Les diastases se comportent comme l'albumine, sauf l'invertine et la pepsine qui ont une élection pour les corps à fonction acide.

En d'autres termes, les granulations colloïdales sont positives ou négatives, suivant qu'elles fixent par adhésivité élective les ions H ou les ions OH. Les granulations amphoter même, manifestent elles aussi leur pouvoir *cataphorétique* fixant tantôt les ions H, tantôt les ions OH, suivant le milieu dans lequel elles sont plongées. En milieu alcalin, l'albumine deviendra électronégative, et électropositive en milieu acide. De là, on peut déduire que toute action enlevant la couche ionique des micelles entraîne leur *floculation* en dehors du courant électrique. En effet, par cette électrisation, les micelles colloïdaux exercent les uns sur les autres une véritable répulsion électrostatique qui s'oppose à leur agglutination. La pepsine, par exemple, floculera en présence de colloïdes de signe contraire, d'électrons riches eux-mêmes en ions OH ou H, la chaleur, l'alcool, etc., et c'est ainsi que s'expliqueront ses incompatibilités, immense champ ouvert aux expériences: nous y reviendrons.

Nature de l'action de la pepsine. — Et maintenant quelle est la nature de l'action de la pepsine? Nous avons dit que c'était une diastase, c'est-à-dire un *catalyseur naturel*, sorte d'animateur, activant et intensifiant l'hydrolyse des albuminoïdes.

Elle présentera donc le caractère fondamental des catalyseurs en général; disproportion le plus souvent énorme

entre la faiblesse de leur masse et la grandeur de l'effet, c'est-à-dire de la quantité de substance attaquée et transformée sous son influence: ainsi les pepsines de Pekelharing, de Nencki les plus pures, hydrolysent jusqu'à 20.000 fois leur poids d'albuminoïdes.

Mais, d'autre part, comme les diastases, elle se différenciera des catalyseurs artificiels.

1° Par plus de *spécificité* dans son action, elle deviendra inerte hors de l'hydrolyse des albuminoïdes. Fischer (1) attribue la spécificité à une parenté stéréochimique de la diastase et du corps à transformer et à la symétrie de cette structure stéréochimique: « La clef qui n'ouvre qu'une serrure »; pour d'autres (Achalme, Bresson), la spécificité serait due au signe de la charge électrique de la micelle et à l'intensité de cette charge.

2° Son action augmentera avec la température jusqu'à un optimum pour retomber ensuite à zéro: nulle à 0°, complète entre 40° et 60°, elle sera détruite à 100°. La température a une grande influence sur la diastase, influence due à l'augmentation d'ionisation de H^2O et des électrolytes dissous, aux modifications des phénomènes d'adsorption et des chocs moléculaires par rapport à la viscosité du liquide. L'action destructive de la chaleur serait un phénomène physico-chimique (non biologique) comme l'a démontré Ernst (2) avec le platine colloïdal qui présente un optimum de température comme les enzymes.

3° Son action sera entravée par les produits même qu'elle a servi à transformer et c'est ainsi que l'on peut

---

(1) Fischer et Niebel. Ueber der Verhalten der Polysaccharide gegen einige tierische Secrete and organe, 1896.

(2) Ernst. Ueber die Catalyse des Knallgazes durch Kolloïdales Platin. *Zeit. J. Physik. Chem.*, 1901, t. 37, pp. 448-484.

comparer le ferment à une meule bloquée par les produits qu'elle a triturés, produits qu'il suffit d'évacuer au fur et à mesure de leur production pour que le travail recommence. Ce fait curieux, nous allons le démontrer *in vitro:*

Nous prenons du digestat ne troublant plus par AzO^3H, ne contenant donc plus que des peptones et des acides aminés; nous saturons par le CO^3Ca. Après cinq minutes d'ébullition pour tuer le ferment, nous filtrons et prélevons 58 gr. 50 de ce liquide comme milieu d'une nouvelle digestion (3 essais).

Pepsine T 100	0,10
Digestat	58,50
HCl dilué	1,50
Fibrine	2,50

Après 6 h. précipité abondant par AzO^3H.
— 7 h. 1/2 id.
— 12 h. id.

L'indigestion demeure donc complète aussi longtemps que l'on n'a pas épuré le milieu des matières transformées qui l'encombrent. « Cette action est due non à une action chimique, mais à l'augmentation de viscosité du milieu; car des solutions isovisqueuses de glycérine, mannite, produisent le même retard que le lévulose sur l'action diastasique de la maltase » (1).

Conditions d'action. — 1° Le point important de l'activité de la pepsine est l'*acidité* du milieu, c'est-à-dire la présence d'ions H. L'acide d'élection est l'acide chlor-

(1) Achalme. Electronique et biologie, p. 518, éd. 1913, Masson, éditeur.

hydrique, le plus dissociable des acides en ses ions H et Cl.

L'acide en solution concentrée est apte à produire seule la réaction et à dédoubler les albuminoïdes, mais il ne peut la produire en solution diluée qu'en présence du ferment.

D'après Bertrand, l'acide et la pepsine seraient *complémentaires* l'un de l'autre: HCl complémentaire *active* et la pepsine complémentaire *activante.*

D'autre part, il y a une relation entre la quantité de pepsine et la quantité d'acide.

D'après Roger et Garnier (1), la dose optima d'HCl « varie avec la teneur en pepsine ».

Quantité de pepsine..		HCl optima
0,25 à 8 ‰ vont	avec	2,5 ‰ d'HCl
16 ‰	—	2,5 et 5 ‰
32 et 64 ‰	—	5 ‰

Un excès d'acide gêne la digestion pepsique et l'effet défavorable de cet excès d'acide est d'autant plus marqué que la teneur en pepsine est moins considérable.

Un excès de pepsine peut de même entraver la digestion, il existe pour le ferment une dose optima:

0,31 à 0,62 HCl pour 8 ‰ de pepsine.

Quand la proportion d'HCl s'abaisse et devient massive, un excès de pepsine favorise la digestion.

La proportion d'HCl dans le suc gastrique normal varie avec les espèces: 1 à 3 ‰ chez l'homme, 5 ‰ chez le chat, 4 à 6 ‰ chez le chien.

---

(1) Roger et Garnier. Influence des variations simultanées de la pepsine et d'HCl sur la digestion peptique. *C. R. Biologie,* LXI, 314, 1906.

2° Une seconde condition d'action de la pepsine est l'*eau*. L'eau est en effet le constituant primordial d'une substance vivante et le solvant où se passent les réactions physico-chimiques propres à la vie; de plus, il est fort possible que les ions H et OH de l'eau pure, quoique très faiblement concentrés, puissent entrer dans la réaction, et surtout, le point important est l'extrême solubilité dans l'eau des ions H de l'acide chlorhydrique (dans le cas qui nous intéresse).

La dessiccation suspend donc complètement l'activité de la pepsine sans lui enlever toutefois un potentiel d'action, et ce potentiel peut même se conserver fort longtemps. Nous avons expérimenté des pepsines desséchées et conservées dans des flacons à bouchon garni de chaux; pendant cinq ans, ces diastases avaient gardé toute leur activité. M. Warren (1) signale même le cas d'un échantillon de pepsine en poudre datant de trente ans qui a conservé une activité égale à 1/500 U S P (le titre primitif étant inconnu); un autre échantillon conservé dix ans avait passé du titre 1/3000 USP au titre 1/2500.

La matière passive. — *Etude résumée des albuminoïdes.* — Pour bien comprendre l'action de la pepsine, pour bien saisir le mécanisme du dosage, il est utile de savoir ce qu'est la matière attaquée et quelles transformations elle subit.

De nombreux chercheurs ont étudié la molécule albuminoïde. Nombreux sont les articles publiés dans les revues scientifiques de tous les pays

L'Angleterre, l'Allemagne et l'Amérique possèdent même des précis très modernes et très au point de la ques-

(1) Warren. *Journal Am. Pharm. Assoc.*, VIII, p. 734, 1919.

tion. Il est regrettable qu'en France, aucun savant n'ait encore exposé cette importante partie de la chimie.

La question d'ailleurs est assez complexe et rendue d'autant plus difficile que non seulement dans les différentes langues, mais encore dans le même vocable, des noms distincts ont été donnés suivant les origines diverses d'où l'on est parti pour étudier la matière albuminoïde.

Les Latins appelaient *albumen,* le blanc d'œuf; de là, on est arrivé à désigner sous le nom d'*albumine-albuminoïdes* tous les corps d'origine vivante qui s'en rapprochent.

Puis, on lui a adjoint la dénomination *matières protéiques,* de protéine (primaire, primitif). Cette appellation qui tend à être substituée au mot albumine a été donnée par Mulder aux flocons blancs qu'il vit précipiter en faisant bouillir un albuminoïde avec KOH et qu'il crut être un noyau fondamental; de là, matières protéiques, celles qui fournissaient des flocons blancs de protéine.

Quoique les recherches ultérieures n'aient pas confirmé les résultats expérimentaux de Mulder, on conserva le nom de protéiques comme synonyme d'albuminoïde.

Actuellement, les travaux de Fischer (1) et Kossel (2) tendent à grouper les protéiques autour de substances fondamentales plus simples qu'ils désignent sous le nom de *protamines ou polypeptides* (amino-acides combinés).

Pour résoudre le problème de la constitution de la molécule albuminoïde (albumine-protéine-polypeptide), on a

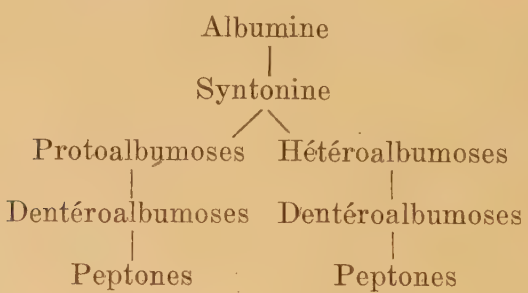
---

(1) Fischer (E.). Untersuchungen uber Aminosauren, Polypeptide and Protéine. *Julius Springer, Berlin.*

(2) Kossel et Pringle (H.). Uber Protamine und Histone IV; Uber das Histome. *Z. Ph. Ch.,* XLIX, 314, 1906.

recours surtout à l'hydrolyse qui brise la molécule et la résoud en ses éléments composants dont trois quelle que soit la substance étudiée, constituent la caractéristique du type protéique : ce sont les *trois bases hexoniques de Kossel* (*lysine, arginine, histidine*) auxquelles viennent se souder un nombre considérable de groupements de nature très variable ; parmi ceux-ci, les *acides aminés ou peptides* sont les plus abondants et les plus fréquents à tel point qu'on a pu définir les protéiques : des polypeptides de haute condensation.

Travail chimique de la pepsine. — Le travail chimique d'hydrolyse de la digestion pepsique avait été schématisé par Kühne et Neumeister (1) d'une façon simple qui, pendant un certain temps sembla réelle :



Malheureusement, ce schéma si clair ne répond pas à la réalité comme l'ont prouvé Pick (2) et Zunz (3) en montrant que, dès le début de la digestion, apparaissent des corps abiurétiques.

---

(1) Neumeister. Bermerk und Chemie der Albumosen und Peptone. *Z. f. Biol.*, N F V, 292, 1887.

(2) Pick. *Zeit. Phys. Ch.*, t. 28, p. 219-287.

(3) Zunz. Ueber dem quantativen Verlauf der Peptischen Eiweiss-spaltung. *Z. Ph. Ch.*, XXV, III, 132, 1899.

La désignation albumose et peptone est ainsi devenue bien imprécise et la précipitation fractionnée sur laquelle on se basait pour suivre la dégradation est malheureusement en défaut. Elle se trouve en relation, non seulement avec l'état de clivage de la molécule, mais encore avec les différents noyaux qui entrent dans les produits de dégradation. Ainsi, on considérait comme albumose, tel produit d'hydrolyse parce qu'il précipitait par $SO^4(NH^4)^2$, alors que cette précipitation était due à un noyau qui floculait par ce sel et non à son état de dégradation.

Toutefois, ce procédé bien qu'empirique et imparfait, rend encore de réels services en établissant quelque distinction entre les différents produits de la protéolyse et en permettant de suivre la formation de ceux-ci au cours de l'action des ferments digestifs.

En résumé, selon nous, on ne peut mieux comparer l'hydrolyse de la molécule albuminoïde qu'à la débâcle de la glace : les glaçons se détachent de la banquise sous l'effet de la chaleur, tantôt gros, tantôt petits, suivant les points de moindre résistance, de même que les parties de la molécule se scindent sous l'action du ferment en fragments plus ou moins complexes.

Mesure de l'activité de la pepsine. — Peut-on enfin arriver à connaître, à mesurer l'activité d'un suc gastrique d'une pepsine? Oui, et diverses méthodes de dosage ont été préconisées qui feront surtout l'objet de cette étude. Toutes ont pour but l'appréciation de l'activité pepsique d'après le temps, soit de la dissolution d'une substance albuminoïde donnée, soit de sa peptonisation, le temps et la substance protéique sont les facteurs qui varient suivant les méthodes.

Nous ne retiendrons que trois procédés les plus employés, les plus perfectibles; ce sont les procédés du Codex français à la fibrine, des Pharmacopées étrangères à l'ovalbumine et le procédé à l'édestine.

Notre méthode de travail consistera à examiner le procédé tel qu'il est donné, les critiques qui peuvent lui être faites et les modifications susceptibles de l'améliorer en nous basant sur le résultat d'expériences que nous avons pu faire.

Les méthodes des Pharmacopées n'ont point une certitude mathématique et ne sont point parfaites. En effet, les lois d'action des diastases (loi des masses de Gulberg et Waage, suivie par la catalase, loi logarithmique des acides, etc.), se vérifient très mal pour la pepsine et les ferment n'agissant pas sur des substances simples, mais sur des colloïdes, il y a une inconnue qui est la grandeur des éléments colloïdaux; cette notion de surface des éléments est capitale surtout pour des solides comme la fibrine et l'albumine. Donc, les lois d'action de la pepsine établies par Schütz (1), par Borrissow (2), par Huppert, ne sont point absolues et définitives.

Mais, comme le fait justement remarquer M. Javillier (3) : « Il ne s'agit pas pour le pharmacien de déterminer le titre exact, le titre limite d'une pepsine, mais de constater si une pepsine répond ou non aux conditions de titres imposées par cette pharmacopée ».

Quant au procédé à l'édestine, il est plus sensible et

(1) Schütz. Methode zur Bestimung der relativen Pepsinmengen. *Z. Ph. Ch.*, IX, 577, 1890.

(2) Borrissow (P.). Diss. Petersbourg, 1891, cité par Pawlow et M. Javillier.

(3) Javillier (M.). Les ferments protéolytiques. Thèse d'agrégation, p. 81, 1909.

plus précis et pourrait très bien devenir le procédé de choix du physiologiste et du clinicien désireux de rechercher la présence de pepsine dans des produits organiques ou de déterminer la valeur d'un suc gastrique.

Dans une deuxième partie, nous nous attacherons à exposer la valeur des différentes sortes commerciales de pepsine et nous rappelerons pour mémoire sa préparation industrielle. Nous examinerons ensuite l'action de quelques produits qui lui sont souvent associés.

DEUXIÈME PARTIE

ETUDE CRITIQUE

DES PROCEDES DE DOSAGE DE LA PEPSINE

CHAPITRE PREMIER

PROCÉDÉ DU CODEX FRANÇAIS

A tout seigneur, tout honneur.

Il est juste de donner la première place au procédé du Codex français; il ne l'usurpe d'ailleurs pas, car, à vrai dire, malgré les imperfections que nous notons plus haut, c'est le plus précis des différentes Pharmacopées. Les éditions successives du Codex y ont apporté des améliorations et actuellement nous avons en France une technique qui va s'approchant de la perfection.

Technique. La voici, telle qu'elle est donnée dans la dernière édition du Codex 1908:

Pepsine	0,10
Eau distillée	58,50
Acide chlorhydrique dilué.....	1,50
Fibrine desséchée (R).....	2,50

Dans un flacon à large ouverture, introduisez la fibrine, l'eau distillée et l'acide chlorhydrique dilué ; placez ensuite ce flacon dans une étuve ou au bain-marie chauffé à

+50° jusqu'à ce que le mélange ait atteint la même température, ajoutez alors la pepsine et faites digérer, pendant six heures, en ayant soin au début d'agiter fréquemment jusqu'à dissolution complète de la fibrine et ensuite toutes les heures environ.

Laissez refroidir et filtrez.

10 centimètres cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas, à la température (ordinaire), se troubler par l'addition de XX gouttes d'acide azotique officinal.

Au lieu de « ordinaire », le supplément du Codex a inscrit: + 17° à + 19° comme température de l'épreuve azotique.

Dans cet essai, on peut remplacer la fibrine desséchée par 10 grammes de fibrine essorée (R); il faut alors réduire à 51 grammes la proportion d'eau distillée.

Eau, acidité, température, temps. — Il y a dans ce dosage quatre facteurs *stables* ne dépendant que du soin et de la surveillance de l'opérateur:

Eau, acidité, température, temps.

Il est facile d'exécuter ces prescriptions à la lettre:

1° 58 *gr.* 50 *d'eau distillée.* — La plus ou moins grande quantité de liquide ferait varier en moins ou en plus le temps de la digestion. L'emploi de l'eau distillée est judicieux, car les eaux riches en sulfate de chaux peuvent apporter un retard dans la dégradation. D'après Effront (1), une dissolution pepsique d'albumine qui se ferait en 31 minutes sans SO^4Ca aurait un retard de 19 minutes en présence de 10 milligrammes pour 100 de liquide.

---

(1) Effront. Catalyseurs biochimiques. Dunod et Pinat, 1914.

2° 1 *gr.* 50 *d'HCl dilué.* — Cet acide dilué correspond à 0 gr. 25 d'HCl gazeux pour mille, il est de densité 1,049.

3° *Température d'expérience:* 50°. — Cette température doit être prise à l'intérieur des flacons avec des thermomètres contrôlés. Le Codex indique l'étuve ou le bain-marie. L'emploi de l'étuve est vraiment défectueux, car la température y est très variable et il est impossible d'agiter le flacon pendant l'opération sans produire des déperditions de chaleur non négligeables. Le bain-marie est de beaucoup préférable en ayant soin que le niveau de l'eau du bain-marie se trouve au-dessus de celui du digestat dans les flacons, la température reste très régulière. Pour les digestions, nous nous sommes servis d'une grande boîte de fer blanc (vide de vaseline) recouverte d'un matelas isolant; une plaque de fer blanc percée de trous forme un double fond et le couvercle de la boîte porte une ouverture laissant passer exactement le thermomètre sans occasionner de déperdition de chaleur. L'installation est pratique et peu coûteuse avec un tout petit bec à alcool, la température ne varie pas de 3 degrés pendant toute l'opération.

4° Le *temps* indiqué pour l'expérience est de six heures à partir de l'addition de pepsine dans les flacons, voici encore un facteur qui peut être suivi par tous.

5° La *température* de l'épreuve azotique n'était pas indiquée dans le Codex 1908; mais, ayant reconnues judicieuses les observations de Byla et de Portes, qui demandaient de fixer une température, le Supplément du Codex (1921) inscrit 17° à 19°.

Nous n'entrerons pas plus dans la discussion de ces facteurs. Est-ce que la pepsine digèrerait mieux à 45° ou

à 55°? Est-ce que l'eau est en quantité suffisante? Peu importe. Il est nécessaire que la même règle soit suivie par tous. Un changement pourrait produire une perturbation dans le procédé; il est préférable que chacun s'en tienne à ces chiffres bien établis.

Critique. — Ce qu'on est en droit de reprocher au Codex français, c'est de n'avoir pas précisé certains détails opératoires de première importance. Celui qui fait pour la première fois un dosage a besoin des plus petits détails de technique, sous peine d'avoir des hésitations et de douter du résultat obtenu.

Par exemple: 1° l'agitation des flacons pendant l'expérience devrait être réglée tous les quarts d'heure pendant les deux premières heures, car l'indication du Codex « jusqu'à dissolution de la fibrine » ne signifie pas grand chose pour la fibrine sèche, la liqueur restant absolument trouble pendant toute l'opération.

2° En outre, en ajoutant l'eau sur la fibrine sèche, celle-ci adhère fortement au fond du flacon et il faut une agitation prolongée pour l'en détacher. L'adhérence est encore bien plus forte si on n'a pas eu le soin d'*homogénéiser* avant l'addition d'HCl.

Ce sont là des détails, mais en n'observant pas ces détails ou en les effectuant différemment, on en arrive à des erreurs de digestion pouvant amener des retards d'une demie et même d'une heure dans le terme du dosage.

Ainsi le démontrent les quelques expériences suivantes:

FLACONS	6 heures	6 h. 1/2	7 heures
1. Témoin homogénéisé	—	—	—
2. Témoin non homogénéisé	+	+	Louche
3. Témoin non homogénéisé	+	—	—

Dans le flacon témoin, la fibrine a d'abord été bien homogénéisée avec l'eau et nous avons ajouté ensuite HCl.

Dans le flacon n° 2, l'eau et HCl ont été versés en même temps sur la fibrine, les agitations ont été effectuées comme dans le n° 1 sans tenir compte des adhérences de la fibrine.

Dans le n° 3, même manière de procéder que pour le flacon n° 2.

Il nous semble donc que l'on pourrait rédiger ainsi le procédé du Codex:

Dans un flacon à large ouverture, introduisez la fibrine, l'eau distillée, *homogénéisez,* puis, ajoutez l'HCl, placez ensuite le flacon dans un bain-marie, chauffez à 50° jusqu'à ce que le liquide du flacon ait atteint 50°; ajoutez alors la pepsine et faites digérer pendant six heures en ayant soin *pendant les deux premières heures d'agiter tous les quarts d'heure.* Laissez refroidir et filtrez: 10 centimètres cubes de la liqueur ainsi obtenue ne doivent pas à la température de 17 à 19° se troubler par addition de XX gouttes d'AzO^3H officinal.

Avec le procédé français, on peut arriver à déterminer l'activité d'une pepsine (à 10 titres près).

On prépare cinq flacons avec fibrine, eau et HCl. En supposant que le titre de cette pepsine soit entre 50 et 100, on ajoute alors dans chaque flacon les quantités de pepsine correspondant aux titres 100, 80, 70, 60, 50. Après six heures de digestion au bain-marie à 50°, on voit celui des digestats qui ne trouble plus par AzO^3H. La pepsine correspond alors à ce titre.

La fibrine. — Et maintenant que nous avons examiné les quatre facteurs précis et stables du procédé français en donnant les quelques modifications susceptibles de l'améliorer, il nous reste à étudier le cinquième facteur, le plus important, puisqu'il est la *mesure* de l'activité fermentaire: la *fibrine*.

« La fibrine qui forme la trame du caillot sanguin, la fibrine qu'on obtient en masses généralement filamenteuses quand on bat le sang au moment de la prise, est une substance protéique; mais à quel groupe appartient-elle? Aux albumines ou aux globulines? Traitons la fibrine par l'eau distillée, nous constatons qu'elle ne se dissout pas; traitons-la par une solution de fluorure de sodium à 8 ou 10 %, ou par une solution de NaCl à 8 ou 10 %, nous la voyons se désagréger et se dissoudre; la liqueur que nous avons ainsi obtenue présente les propriétés des solutions de globulines: elle précipite par l'acide acétique ou par la dialyse; elle précipite et précipite totalement par saturation de sulfate de magnésie. La fibrine est une globuline » (1). C'est en effet une orthoprotéine basique du genre globuline.

---

(1) Arthus (M.). La Physiologie, p. 101 et 102. Masson et Cie, éd., 1920.

La fibrine a été proposée par Corvisart et Guibourt et elle fut acceptée pour le dosage de la pepsine par la Commission de la Société de pharmacie (1865) (1), il s'agissait alors de la « fibrine fraîche, humide, mais non mouillée ».

Le Codex 1884 spécifia ensuite « la fibrine de porc lavée et fraîchement essorée ».

Le Codex 1908, dans sa formule de dosage, a inscrit la fibrine desséchée à l'étuve à 40°, mais, en note, il indique qu'on peut remplacer les 2 gr. 50 de cette fibrine desséchée par 10 grammes de fibrine essorée.

La fibrine fraîche, *essorée à fond*, est encore le meilleur produit lorsqu'on peut se le procurer sur place. Malheureusement, elle donne des déboires, car souvent elle n'est pas suffisamment essorée et, de plus, elle s'autolyse très vite.

Des expérimentateurs très habitués obtiennent avec la fibrine fraîche, des résultats rapides. C'est ainsi que P. Byla (2) indique qu'avec un œil exercé, en cinq minutes au plus, on peut reconnaître la valeur d'une pepsine par le temps plus ou moins long qu'elle met à fluidifier une gelée formée par une fibrine essorée en présence d'HCl et d'eau à 52°.

Vu les difficultés à se procurer communément de la fibrine fraîche, Macquaire (3) propose alors, en 1900, la

---

(1) Rapport sur la pepsine fait à la Société de Pharmacie de Paris par une Commission composée de MM. Guibourt, Boudet, Boudault, Regnauld auxquels se sont joints M. Bussy et le docteur Lucien Corvisart. *J. Ph. Ch.*, 4e s., II, 81, 1865.

(2) Byla (P.). Les produits biologiques médicinaux, p. 37, 1904.

(3) Macquaire. Titrage de la pepsine. *J. Ph. C.*, XVI, 289, 1902; — De l'emploi de la fibrine desséchée et pulvérisée dans l'essai de la pepsine. *J. Ph. Ch.*, XII, 67, 1900.

fibrine de porc séchée à l'étuve à 40° et le Codex l'adopte dans son édition de 1908. Malheureusement, les fibrines sèches ne répondent point à ce qu'on était en droit d'attendre et ne sont point toutes égales entre elles. Il se produit pendant le lavage et le séchage à l'étuve, une autodigestion même si l'opération est bien conduite.

Sur cette question de l'*autolyse* des fibrines, Choay (1), dans sa thèse de 1911, signalait les différences existant entre les fibrines: quantité variable de produits solubles, provenant de l'autolyse, différences de solubilité par l'HCl. Est-ce que ces variations proviennent, selon la remarque de Gessard « de la fixation plus ou moins abondante des diastases du sang »? En tout cas « quelle que soit l'origine de ces diastases, — traces de trypsine pancréatique, diastases de désagrégation des leucocytes, — elles provoquent de profondes modifications autolytiques ».

Nous avons repris cette étude sur des échantillons très divers de fibrines préparées suivant le procédé Codex.

Voici comment nous avons opéré:

1° Nous avons mis 2 gr. 50 de fibrine à macérer pendant six heures dans 50 cc. d'eau distillée aux environs de 0°. Après filtration, nous prélevons 25 cc. dont nous faisons l'extrait sec:

---

(1) Choay. Des extraits opothérapiques, 1911, Vigot frères.

FIBRINES 1 gr. 25	EXTRAIT SEC sur 1 gr. 25	RÉACTION du biuret	TOUCHE azotique
Fibrine de cheval (procédé Codex)	0,240	Réaction forte	Positive
Fibrine de porc (procédé Codex)	0,110	Réaction faible	Positive
Fibrine de cheval ébouillantée	0,021	Réaction très faible	Négative
Fibrine séchée dans le vide à 0°	0,07	Réaction faible	Positive faible

Ces résultats obtenus sur 25 cc. = 1 gr. 25 de fibrine mettent en évidence l'autolyse importante qui se produit pendant la préparation de la fibrine par le procédé Macquaire adopté par le Codex. En effet, la fibrine où l'on a détruit les ferments autolysants par l'ébouillantage, donne un extrait sec insignifiant.

2° Nous avons prélevé à nouveau 2 gr. 50 de fibrine. Après macération dans 50 cc. d'eau distillée au bain-marie pendant six heures, nous avons filtré et prélevé 25 cc. du filtrat = à 1 gr. 25 de fibrine; nous en avons alors fait l'extrait sec.

Tableau

FIBRINE 1 gr. 25	EXTRAIT SEC	TOUCHE AZOTIQUE
Fibrine cheval (procédé Codex) étuve à vide à 40°	0,433	+ abondant
Fibrine de porc (procédé Codex) étuve à vide à 40°	0,665	+ abondant
Fibrine de cheval ébouillantée	0,045	— négative

Il est facile de voir par la comparaison de ces deux tableaux que l'autolyse s'est continuée au bain-marie à 50° ; la différence des extraits secs est trop grande pour ne l'attribuer qu'à des produits plus solubles à chaud qu'à froid.

Cette question de l'autolyse a une grosse importance. Supposons qu'une pièce d'étoffe de 10 mètres soit mesurée par le vendeur avec un mètre trop court de 10 centimètres et par l'acheteur avec un mètre auquel il manque 5 centimètres, ils ne s'entendront point sur la dimension de cette étoffe. Il en est de même pour les pepsines dont les titres seront différents suivant le degré d'autodigestion de la fibrine.

Nous avons essayé de stabiliser la fibrine. Malheureusement, la question est très complexe, car il faut détruire l'activité des diastases autolysantes au sein de la fibrine

sans dénaturer cette fibrine elle-même; les moyens violents seraient comme le pavé de l'ours.

L'ébouillantage très court, pensions-nous, pouvait peut-être donner des résultats. La fibrine était étendue sur des tamis et plongée deux minutes dans l'eau bouillante; ensuite, on l'immergeait dans l'eau froide. Ainsi traitée, la fibrine ne s'autolysait plus, la stabilisation était parfaite. Mais, l'action très brève pourtant de la chaleur avait coagulé sans doute en partie cette fibrine: elle avait perdu son pouvoir d'adsorption vis-à-vis de l'acide chlorhydrique et ne formait plus de gelée avec lui; de plus, la digestion était beaucoup retardée.

Nous avions alors limité l'ébouillantage à une minute: les effets étaient moins accentués, mais une pepsine T 300 ne mesurait encore avec cette fibrine que 250 comme activité diastasique.

La question de stabilisation des fibrines reste donc entière. Il est regrettable que nous n'ayons pu la résoudre, car l'autolyse est une cause importante des écarts de titre donnés quelquefois par le procédé français. Comme nous le disions, cette question est très complexe et on est peut-être loin d'une solution. En effet, il faut détruire des colloïdes (diastase d'autolyse, érepsine) au milieu d'autres colloïdes (fibrine) et sans altérer ces derniers. Jusqu'à résultats, nous donnons la préférence à la fibrine fraîche, essorée à fond ou à la fibrine desséchée à basse température.

Complément du procédé Codex. — *Méthode à l'amino-formol de Sôrensen.* — Il est un procédé par dosage des amino-acides qui complète assez bien celui du Codex français, c'est le procédé de Sorensen à l'amino-formol. On l'emploie surtout dans les digestions retardées lorsque

l'épreuve azotique est positive, et l'on juge par le titrage des amino-acides formés de combien la digestion est déficiente.

Théorie. — Nous avons vu que les amino-acides étaient les matériaux élémentaires, le dernier stade de dégradation des molécules albuminoïdes, apparaissant donc à la fin du clivage digestif de ces molécules. Ils sont peu abondants après la digestion pepsique, beaucoup plus abondants après la digestion pancréatique.

Les acides aminés sont des dérivés d'acides organiques (le plus souvent monobasiques et de la série acétique, rarement bibasiques et de la série succinique) par substitution d'un ou très rarement de deux groupes amidogènes NH^2 à 1 ou 2 atomes d'H au radical hydrocarboné de ces acides; et, d'une *manière constante,* le groupe NH^2 quand il est seul, un de ces groupes quand il y en a 2, est fixé à l'atome de carbone qui est en contiguité avec le carboxyle fonctionnel c'est-à-dire en position α.

En un mot, tous les acides aminés naturels c'est-à-dire provenant de la désagrégation des protéiques connus répondent au schéma suivant:

$$\begin{array}{l} \quad\ R \\ \quad\ | \\ H-\overset{\alpha}{C}-NH^2 \\ \quad\ | \\ COOH \end{array} \quad \text{ou} \quad \begin{array}{l} NH^2-\overset{\alpha}{CH}-COOH \\ \quad\ | \\ \quad\ R \end{array}$$

dans lequel le carbone α est dissymétrique, sauf dans le cas ou R = H c'est-à-dire pour le premier: l'acide amino-acétique du glycocolle $H^2N-\overset{|}{\underset{H}{CH}}-COOH$.

Tous ces acides renfermant le groupement

$$\begin{array}{l} | \\ CH - NH^2 : \\ | \\ COOH \end{array}$$

1° Quand NH^2 est intact (comme c'est un groupe ammoniacal) il réagit sur COOH et la molécule est sensiblement neutre, on peut admettre qu'il se forme une sorte de sel ammonium composé interne $\begin{array}{l} -CH-NH^3 \\ \quad | \quad | \\ \quad C---O---O \end{array}$ comparable à un formiate de méthyle ammonium; ce sel interne est peu stable.

2° Dans certains cas, NH^2 est substitué, substitution faite soit par un radical alcool et son caractère basique augmente, soit par un radical d'acide et son caractère acide augmente alors.

3° Si NH^2, tout en restant intact, est au voisinage plus ou moins proche d'un autre NH^2 (ex. ornithine et lysine) la basicité augmente; tandis que, si NH^2 est au voisinage plus ou moins proche des autres COOH (ex. acide aspartique et glutarique) l'acidité augmente.

Si l'on ajoute du CH^2O à un acide aminé NH^3 réagit et on a:

$$-NH^2 + OCH^2 = H^2O + -N-CH^2$$

le groupement ainsi obtenu est neutre, on réalise le BLOQUAGE DE LA BASICITÉ.

La molécule prend alors un caractère acide accentué d'où possibilité d'un dosage acidimétrique. Voilà tout le principe de la méthode de SHIFF, SORENSEN.

TECHNIQUE. — Dans la pratique, on procède de la façon suivante:

Au bout de 6 h., 8 h., 12 h., on filtre le digestat du procédé Codex.

On en prélève 10 cc., on ajoute 10 cc. d'eau, puis X gouttes de solution alcoolique de phénolphtaléine, enfin de la soude N/10 à neutralisation.

On note le nombre de centimètres cubes de soude versés. On ajoute alors 25 cc. de formol commercial *exactement neutralisé.*

La coloration rose disparaît par suite de la libération des COOH.

On verse ensuite de la soude jusqu'à réapparition de la teinte rose; on note de nouveau le volume de soude versée.

Soit Nc^3 ce volume.

On le corrige en lui ajoutant un trentième de sa valeur soit 1 cc. pour 3 cc. de solution N/10 employés ou plus simplement en ajoutant au coefficient 14 de l'azote un trentième de sa valeur, soit 0,46.

$$0{,}001446 \times NccNaOH \times V : 10$$

N: nombre de cc. de soude N/10 versés après addition de formol.

V: volume total du digestat.

On obtient pour 2 gr. 50 de fibrine sèche à la fin d'une bonne digestion de six heures, environ 0 gr. 030 à 0 gr. 038 d'azote. Il est nécessaire de faire pour chaque expérience trois dosages et de prendre la moyenne, car les virages sont peu nets et il peut se produire des erreurs.

CHAPITRE II

PROCÉDÉS DES PHARMACOPÉES ÉTRANGÈRES

Laissons maintenant le procédé à la fibrine pour passer à celui du blanc d'œuf. Fait curieux, ce procédé français, le meilleur, le plus exact, est resté propre à la France si l'on excepte l'Espagne qui l'a modifié d'une façon malheureuse. Toutes les pharmacopées étrangères, en effet, ont adopté, pour le dosage de la pepsine, l'ovalbumine coagulée par la chaleur et la plupart apprécient la pepsine à la vitesse de solubilisation sans tenir compte de la peptonisation.

Ces dosages offrent quelques variantes suïvant les pays et, d'une façon générale, ils sont bien moins précis que le dosage du Codex français, on pourra d'ailleurs se rendre compte des variations par le tableau suivant:

Tableau

PHARMACOPÉES	Blanc d'œuf gr.	PEPSINE	HCl	EAU cc.	Température	Temps	TOUCHE azotique	EXTRAITS
Angleterre 1914	12.50	0,005	0,2 0/0	125cc.	40 à 41°	6 h.		
Japon 1907	10 cuit 6 min. tamis 4	0,10	0cc.50	100	45°	2 h.		Extrait sec 0 gr. 50 à 100°
Hongrie 1909	10 cuit 5 min.	0,10	2cc. HCl dilué	95	40°	1 h à 2 h.		
Belge 1906	10 tamis 10	0,10	0,25 0/0	100	40°	1 h.		
Italienne 1909	10	0,10	0,25 0/0	100	38 à 40°	2 h. dissolution 10 h. peptonis	Touche azotique	
Russe 1910	10	0,10	1gr. HCl	100	40 à 45°	4 h.		
Allemagne	10	0,10	0,50 HCl	100	45°	3 h.		
Etats-Unis	10	0 01	2cc. HCl	100	52°	2 h. 1/2		

Et voici maintenant *in extenso* les procédés du Codex allemand et du Codex belge.

Procédé allemand. — L'albumine que l'on obtient après refroidissement d'un œuf de poule laissé durant dix minutes dans l'eau bouillante, est broyée dans un tamis spécial pour l'obtention d'une poudre d'apparence grossière.

On répartira proportionnellement 10 grammes de cette albumine réduite avec 100 cc. d'eau à 50° et 0,5 d'HCl, on ajoutera à ce mélange 0 gr. 10 de pepsine.

Faire digérer à 45° pendant trois heures en remuant fréquemment. L'albumine doit ainsi être dissoute et laisser tout au plus quelques petits flocons de couleur jaunâtre.

Procédé belge. — On maintient dix minutes dans l'eau en ébullition un œuf de poule frais. Après refroidissement, on enlève le blanc que l'on divise en le faisant passer par frottement à travers le tamis n° 10. On dissout par trituration 0 gr. 10 de pepsine dans 100 gr. d'eau contenant 0,25 % d'HCl; on verse la solution dans un ballon d'environ 200 cc.; on ajoute 10 gr. de blanc d'œuf, on agite et on chauffe au bain-marie à la température de 40° en agitant de temps en temps. Après une heure de digestion, le blanc d'œuf est dissous en laissant seulement quelques petits flocons.

Critiques. — Il est facile à la simple lecture même d'apercevoir les points faibles de ces énoncés.

1° La cuisson du blanc d'œuf plus ou moins prolongée donne de notables variations dans le temps de dissolution.

Voici quatre expériences (faites avec la même pepsine et au même bain-marie) qui le prouvent surabondamment.

Flacons	Blanc d'œuf tamisé	Temps de cuisson	Dissolution
1	10 gr.	10 minutes	1 h. 40
2	10 gr.	10 minutes	1 h. 40
3	10 gr.	25 minutes	2 h. 15
4	10 gr.	25 minutes	2 h.

Il est donc important de bien surveiller la cuisson. L'œuf plongé *exactement* dix minutes dans l'eau bouillante est immergé ensuite dans l'eau froide pour faire cesser aussitôt l'effet coagulant de la chaleur.

2° Le blanc d'œuf est une matière contenant beaucoup d'eau; dans le procédé, on prend 10 gr. de blanc d'œuf humide, or le temps plus ou moins long de tamisage, l'intervalle entre la tamisation et les pesées, la température ambiante plus ou moins élevée, la sécheresse ou l'humidité du climat, apportent des variations appréciables dans la quantité de matière à digérer. Le tableau suivant indique cette perte rapide d'eau:

Echantillons d'ovalbumine cuite : 5 gr.	Température	Temps	Perte de poids
1 coupé gros.....	25°	15 h.	2 gr. 030
2 fin	25°	15 h.	2 gr. 220
3 tamisé	25°	15 h.	3 gr. 80
4 tamisé	50°	2 h.	1 gr. 45
5 tamisé	50°	1/4 h.	0 gr. 301
6 tamisé	100° à poids constant d. le vide		4 gr. 25
7 tamisé	à 40°	id.	4 gr. 35

Les opérations de tamisage et de pesée du blanc d'œuf demandent à être faites rapidement sous peine d'avoir

des quantités variables de matière à digérer dans les 10 grammes d'ovalbumine pesée.

3° La division du blanc d'œuf est aussi un élément d'avance ou de retard de la dissolution. Plus une substance sera divisée, plus elle offrira de surface à l'action diastasique. Cette expérience *in vitro* démontre la grande importance de la mastication sur la bonne marche de la digestion. « *Prima digestio in ore* » disaient les Anciens, ils ne voulaient point parler de l'action diastasique de la salive qu'ils ignoraient, mais de la nécessité de la mastication.

Voici quatre expériences que nous avons faites avec la même pepsine et au même bain-marie.

Dans l'intérêt de la démonstration, nous avons poussé à l'extrême les différences de division du blanc d'œuf.

Blanc d'œuf : 5 gr.	Temps de dissolution	Reste
Tamis 30	3 h. 1/2	légers flocons
Tamis 10	4 h. 20	légers flocons
Coupé gros	12 h.	légers flocons
Un seul morceau.....	12 h.	2 gr. 75

4° En plus, défaut commun à la fibrine d'ailleurs, l'homogénéisation du blanc d'œuf tamisé est très importante et assez difficile à obtenir. Il se prend en masses plus ou moins volumineuses et une forte agitation est nécessaire pour le diviser. Le meilleur moyen pour obtenir une répartition homogène consiste à l'émulsionner au mortier avec le liquide: ce procédé n'est indiqué que dans la Pharmacopée anglaise de 1914. Mais, si un opérateur le divise au mortier et que l'autre ne procède pas ainsi, ils arrivent à des résultats très différents, nous avons obtenu les chiffres suivants:

10 gr. de blanc d'œuf (tamisé *seulement*) ont été dissous à 50° en 4 h. 30.

10 gr. de blanc d'œuf (tamisé et *émulsionné*) ont été dissous à 50° en 3 heures.

5° Le terme de la dissolution est très difficile à apprécier. Qu'entend-on par petits flocons? Comment arriver à distinguer ces petits flocons (débris de membrane) des parcelles d'albumine dissoutes en partie seulement? Malgré les nombreux essais au blanc d'œuf que nous avons faits, il nous est toujours resté une hésitation devant les « quelques petits flocons ». Pour atténuer ce doute et réduire au minimum les causes d'erreur, nous nous servons d'un flacon témoin avec une pepsine « standard » (titre fort) dosée par le procédé français, par le procédé à l'édestine et par celui au blanc d'œuf. Cette pepsine conservée dans un flacon exsiccateur à bouchon contenant de la chaux vive, gardera très longtemps son titre et servira de terme de comparaison. C'est là une manière toute personnelle et nullement indiquée par les différentes pharmacopées.

6° Les pharmacopées étrangères ont le tort de se baser pour apprécier une pepsine sur la limite de dissolution de l'ovalbumine et non sur son activité peptonisante, la seule chose importante au point de vue de sa valeur.

Une pepsine peut, en effet, dissoudre très rapidement et peptoniser bien plus lentement; de là, dérive fréquemment la non-concordance entre le titre de la même pepsine apprécié d'après le procédé français et les procédés étrangers:

Voici trois essais faits avec des pepsines d'origine diverse:

10 gr. de blanc d'œuf ont été dissous à 40° par une pepsine française en 4 heures et demie et l'épreuve azotique (peptonisation), a été négative après 11 heures et demie.

10 de gr. de blanc d'œuf ont été dissous en 3 heures par une pepsine allemande et l'épreuve azotique (peptonisation) a été négative après 17 heures et demi.

10 gr. de blanc d'œuf ont été dissous en 1 heure par une pepsine belge et l'épreuve azotique a été négative après 12 heures et demi.

En résumé, ce procédé au blanc d'œuf, préconisé par les pharmacopées étrangères, manque de précision et de sécurité, car il peut y avoir:

1° Erreur sur la quantité de matière à digérer due à la rapide dessiccation du blanc d'œuf;

2° Erreur provenant de la plus ou moins bonne homogénéisation et de la plus ou moins fine division;

3° Erreur sur la valeur d'une pepsine *peptonisant* bien et dissolvant moins bien.

Procédé au blanc d'œuf desséché. — Nous avons pensé qu'il serait peut-être possible de remplacer ce blanc d'œuf fraîchement cuit par une poudre de blanc d'œuf desséché et pulvérisé dans les mêmes conditions que la fibrine du Codex; ce produit est stable, de conservation indéfinie et facile à employer.

Dans ce but, nous avons fait cuire des œufs en les plongeant dans une grande quantité d'eau à l'ébullition et cela, dix minutes exactement notées, puis nous les avons immergés dans l'eau froide.

Nous avons obtenu: 492 gr. de blanc d'œuf. Après dessiccation à l'étuve à vide à 40°, il reste: 65 gr.; le blanc d'œuf sec a été pulvérisé et passé au tamis 120.

10 gr. de blanc d'œuf = 1 gr. 30 de poudre d'œuf desséché

Nous avons opéré ensuite comme il est indiqué pour la fibrine dans le Codex français:

Pepsine	X
Poudre d'œuf	1 gr. 30
HCl dilué	1 gr. 50
Eau distillée	58 gr. 50
Température	50°
Temps	6 h.

10 cc. filtrés sont soumis à l'épreuve azotique.

Nous avons constaté après de nombreuses expériences que la poudre de blanc d'œuf était plus longue à digérer que la fibrine desséchée, mais qu'il serait facile d'arriver à des résultats constants et de régulariser ainsi les dosages au blanc d'œuf.

Voici les résultats obtenus après de nombreux essais et beaucoup de tâtonnements:

1 gr. 30 de poudre de blanc d'œuf desséchée dans le vide à 40° et pulvérisée (tamis 120) équivaut à 10 gr. de blanc d'œuf fraîchement cuit 10 minutes.

1 gr. 30 donnera une touche négative à l'AzO^3H après six heures de digestion à 50° avec 10 centigrammes d'une pepsine équivalant au titre 200 français.

Il est très probable que les nouvelles éditions des pharmacopées étrangères amélioreront leur procédé de dosage de la pepsine en tendant vers la précision ou même lui substitueront une méthode au blanc d'œuf desséché ou à l'édestine.

CHAPITRE III

MÉTHODE DE DOSAGE DE LA PEPSINE PAR LE PROCÉDÉ A L'ÉDESTINE

Il est souvent utile en clinique et en physiologie de connaître la valeur diastasique d'un suc gastrique. Le procédé employé généralement pour cette détermination est celui des tubes de METT (1).

On aspire dans des tubes de verre de 1 à 2 millimètres de diamètre, de l'albumine d'œuf liquide; on la coagule à une température de 95°; on découpe ces tubes en petits morceaux qui sont immergés dans 1 ou 2 cc. du liquide d'expérience et laissés à l'étuve à 37-38°, pendant dix heures.

Ce procédé a été très critiqué par NIERENSTEIN et SCHIFF (2). La solution diastasique n'atteint l'albumine à digérer que par diffusion et les substances en contact ne se renouvellent pas assez rapidement; de plus, il se trouve souvent des bulles d'air incluses dans l'albumine; de là, erreur dans la mensuration, etc.

---

(1) METT (S.-G.). Contribution à la physiologie des sécrétions. Diss. en russe, 1889, et *Arch. f. Anat. u. Physio. Phys. Abt.*, 58-1894 .

(2) NIERENSTEIN et SCHIFF. Ueber die Pepsinbestimmung nach Mett. *Arch. f. Verd. Kr.*, VIII, 559, 1902, d'apr. *Bioch.*, I, 232, 1903.

Un procédé beaucoup plus rapide et plus pratique tend à supplanter les tubes de Mett, c'est la méthode à l'édestine de Fuld et Levisson. Ce procédé fut modifié par Bailly pour l'adapter aux dosages des pepsines commerciales. Il a été étudié de nouveau dans *The Journal Biological Chemistry,* en mars 1921.

L'édestine. — *Préparation de l'édestine.* — L'édestine est une globuline végétale extraite par Rithausen et Osborne (1881) des graines de chênevis (chanvre).

En lisant les auteurs Osborne, Aberhalden, Hawk, la préparation semble facile, mais il n'en est point de même dans la pratique.

Voici le procédé d'extraction que nous employons après avoir fait un choix dans les différentes méthodes.

Un lot de chènevis grossièrement broyé est mis à macérer pendant 24 heures avec 10 litres d'éther sulfurique afin d'enlever l'huile qui nuirait à l'expérience. La liqueur surnageante est ensuite siphonée; de nouveau, on ajoute au résidu 10 litres d'éther, on siphone après 12 heures. On fait une nouvelle macération de 6 heures avec 5 litres d'éther. (Le chènevis est une semence très riche en huile, et le passage à la presse nous aurait évité d'employer autant d'éther.)

La poudre ainsi dégraissée est séchée à l'air.

Cette poudre est mise dans un flacon à large ouverture avec une solution de NaCl à 5 % (1 kilo de poudre pour 2 kilos de solution); le tout est laissé au bain-marie à 60° pendant une heure en agitant de temps en temps.

On filtre sur papier humecté de solution de NaCl à 5 % dans un entonnoir à courant d'eau chaude à 60° c.

D'après certains auteurs, l'édestine devrait cristalliser par refroidissement de la solution, ce que nous n'avons

jamais obtenu, même après avoir amorcé la cristallisation.

Il est nécessaire de faire précipiter l'édestine en étendant le filtrat d'une grande quantité d'eau; il se dépose alors une poudre blanche formée de cristaux très petits. On décante, on lave.

On centrifuge, on lave à nouveau dans le centrifugeur, d'abord, à l'eau, puis à l'alcool à 90°.

On obtient ainsi une pâte blanche que l'on dessèche à l'étuve à 40°. Une fois sèche, cette pâte brunit et s'agglomère en masses cristallines.

On peut faire cristalliser l'édestine en la dissolvant dans NaCl à 5 %; on la précipite par l'eau, on la met sur un filtre ou on évapore sur des plateaux.

Il est indispensable de faire ces opérations en ajoutant quelques gouttes de toluène, car les fermentations se produisent vite.

Propriétés et caractères. — Cette édestine possède les propriétés générales des globulines végétales:

1° Elle ne se dissout pas dans l'eau pure.

2° Elle se dissout dans les solutions de NaCl à 5 % et à 10 %, dans les solutions de sels neutres.

3° Elle est précipitée de sa solution chlorurée par HCl.

4° Elle est soluble dans une solution de HCl à 0,25 ‰ et elle en est précipitée totalement par NaCl à saturation.

5° Elle est précipitée de sa solution chlorhydrique par AzO^3H.

6° Elle donne la réaction de Millon.

Modes opératoires des dosages. — Le dosage d'une pepsine par l'édestine est basé sur la précipitation de l'édestine en solution chlorhydrique par NaCl ou par l'acide azotique.

Dans le procédé Fuld, la fin de la digestion est indiquée par ce fait que la liqueur reste claire après addition de NaCl.

Dans le procédé américain, on ajoute le NaCl au début de l'opération et le terme de la digestion est marqué par la disparition du précipité.

Dans la modification de la méthode Fuld, indiquée par Bailly, la précipitation par l'AzO^3H montre que la digestion est incomplète.

Procédé Fuld (1). — Le procédé Fuld est assez complexe.

1° Prendre 90 cc. HCl N/10 et faire 300 cc. en ajoutant de la solution physiologique ou simplement de l'eau.

2° Dissoudre 0,20 d'édestine dans 200 cc. de solution (1) bien délayer dans un petit mortier et quand la solution est complète, filtrer pour avoir un liquide clair.

3° *a*) Dissoudre 0 gr. 50 de pepsine type dans 50 cc. d'eau physiologique. Quand tout est dissous, filtrer.

b) Cette solution type à 1 % est étendue successivement à 0,5 %, en ajoutant un égal volume d'une solution renfermant 60 cc. HCl N/10 pour 100 cc.

c) Puis, à 0,05 % avec une solution HCl (1).

4° Dissoudre 10 gr. de sel marin dans l'eau distillée et compléter à 100 cc. Filtrer.

On prépare 10 tubes de 1 centimètre de diamètre renfermant chacun 2 cc. de solution (2), puis, 0,9, 0,8, 0,7... 0 cc. solution (1) et 0,1, 0,2, 0,3... 1 cc. de solution diastasique à 0,5 % ou à 0,05 %.

Après 30 minutes à la température *ordinaire,* on ajoute

---

(1) Fuld et Levison. Die Pepsinbestimmung mittelst der Edestin-probe. *Bioch. Zeitsch.,* VI, 473, 1907.

dans chaque tube 1 cc. solution (4) et l'on note le tube où la précipitation ne se produit plus.

En prenant une solution de pepsine type à 0,5 %, il n'y a de précipitation dans aucun des tubes.

En prenant une solution de pepsine à 0,05 %, il y a:

Solution de pepsine.. cc.:	0,1,	0,2,	0,3,	0,4,	0,5,	0,6,	0,7,	0,8
Précipitation	+	+	+	+	+	+	—	—

La précipitation cesse d'apparaître avec 0,7 cc. de solution de pepsine à 0,05 %.

100 cc. solution de pepsine à 0,05 % = 0,05 de pepsine type; par suite 0,7 cc. de solution pepsique à 0,05 % renferme 0,00035 psepsine type.

Donc, 0,00035 gr. pepsine = 2 cc. de solution (2) = 2 mm. d'édestine, d'où 1 gr. pepsine $= \frac{2}{0{,}00035} = 5{,}714$ cc. = 5 gr. 714 d'édestine.

La force de cette pepsine qu'on prendra pour type de comparaison est donc de 5714 unités.

Cette méthode est très précise et nous a servi pour rechercher l'existence d'une pepsine dans des liquides biologiques ou pour mesurer l'activité d'un suc gastrique.

Procédé américain. — Voici, en résumé, la méthode qui a été publiée dans *The Journal Biological Chemistry*, de mars 1921.

On prépare:

1° Une solution à 1 % d'édestine dans l'eau chlorhydrique.

2° Une solution de pepsine:

Pepsine	1 gr.
HCl 0,05 N.....	5 cc.
Eau q. s. p.....	100 cc.

filtrer.

3° Une solution de NaCl 10 %. Filtrer.

Prendre 6 tubes à essai.

On introduit successivement les réactifs:

D'abord la quantité de solution 1 p. 100 d'édestine,

Puis, l'HCl 1/10 N,

Ensuite, le NaCl 10 p. 100,

Et finalement la pepsine.

On introduit 0,25 cc. de solution d'édestine 1 % dans le tube 1 et on augmente de 0,25 cc. par tube jusqu'au quatrième. On fait les tubes 4, 5, 6 en triple comme contrôle, car l'édestine y est à forte concentration et la précipitation se fait quelquefois sous forme de grumeaux très compacts et très résistants à l'action de la pepsine.

On ajoute 0,1 NHCl en décroissant de 0,25 cc. et en commençant par 0,75 cc. dans le tube 1. (Les tubes 4, 5, 6 n'en reçoivent pas.)

Ajouter ensuite à chacun des tubes, 1 cc. de NaCl à 10 % qui précipite l'édestine. Ne pas agiter les tubes à ce moment.

On ajoute alors 1 cc. de la solution à 1 % de pepsine dans HCl 0,05 N.

Aussitôt la pepsine ajoutée, on agite horizontalement le tube en veillant à ce que l'édestine ne soit pas projetée à l'extérieur.

Ne pas secouer trop violemment, car l'édestine tend à former un grumeau dur et qu'il est souhaitable de conserver à l'état de floculation.

Placer les tubes complets à l'étuve à 37°5 et les agiter doucement toutes les 5 minutes.

La réaction est terminée au moment précis où la protéine précipitée est complètement liquéfiée et les tubes parfaitement clairs; ce qui est parfaitement net aux basses concentrations. Quant à l'erreur aux plus hautes con-

centrations (tubes 4, 5, 6), elle ne dépasse guère plus de 15 secondes.

Procédé de Bailly. — On prépare :

1° Une solution de 0 gr. 50 d'édestine dans 100 cc. d'eau chlorhydrique à 2,5 ‰. On filtre.

2° Une solution de pepsine à 0 gr. 50 pour 100 cc. d'eau chlorhydrique à 2,5 ‰. On filtre.

On prend une série de tubes à essai :

On met 20 cc. de solution d'édestine dans chaque tube que l'on place au bain-marie à 50°.

Après 10 minutes, on ajoute (en notant soigneusement l'heure et en laissant une minute entre chaque tube) la solution de pepsine : 1 cc., 2 cc., 3 cc., 4 cc., 5 cc., 6 cc.

On laisse à la température de 50° pendant 15 minutes. On sort du bain-marie à 50°, on plonge rapidement dans l'eau à 17° et en même temps, on ajoute XXX gouttes d'AzO^3H officinal : il ne doit pas se produire de précipité dans le tube où la quantité de pepsine est suffisante pour effectuer la digestion. Bailly tolère une légère opalescence égale à une goutte de lait.

Voici la gamme des troubles et précipités obtenus dans les digestions de 0.10 d'édestine par 0,02 de pepsine :

Titre 100 : Réaction limite.

Titre 90 : Opalescence égale à II gouttes de lait dans 20 cc. d'eau.

Titre 80 : Louche nette.

Titre 60 : Précipité.

Titre 40 : Précipité abondant.

Voici maintenant les temps de digestion en mettant la même quantité de pepsine dans tous les tubes :

0,02 de pepsine T 100 donne la réact. limite en 1/4 heure

— T 80 — — 21 minut.

—	T 60	—	—	27 minut.
—	T 50	—	—	1/2 heure

On peut résumer ainsi:

0,02 de pepsine Codex T 100 à 50° en 15 minutes digère 10 centigr. d'édestine dissous dans 20 cc. à 2,5 ‰ d'HCl et ce liquide additionné de XXX gouttes d'AzO^3H à 17° ne donne plus qu'une opalescence extrêmement faible égale au trouble d'une goutte de lait dans 20 cc. d'eau.

Amélioration. — Bailly admet comme terme de la réaction le trouble plus ou moins grand produit par l'AzO^3H et, l'opalescence limite serait celle équivalant à une goutte de lait. Nous préférons de beaucoup le mode d'appréciation que nous avons employé. Nous plongeons nos tubes après la digestion dans un grand cristallisoir contenant de l'eau à 17° (nos tubes y sont tenus très penchés) et nous versons le long de la paroi les gouttes d'AzO^3H. Après avoir noté l'apparition de l'anneau (1/4, 1/2, 1 minute), nous mettons nos tubes dans un support et 15 minutes après, nous mesurons la hauteur de cet anneau. Nous nous servions comme terme de comparaison d'une pepsine de titre bien connu. Cela va sans dire que les tubes doivent être de même diamètre.

Cette appréciation est impossible lorsqu'il y a *précipité,* c'est-à-dire avec une pepsine de titre vraiment trop faible; mais alors, en versant l'acide azotique, on voit une traînée blanche se produire dans le liquide sur tout le parcours de la goutte d'AzO^3H.

Cette méthode de mensuration des anneaux nous a beaucoup servi pour juger de l'affaiblissement de titre produit par les incompatibilités.

Pour des recherches délicates sur des sucs gastriques

ou des pepsines de titre absolument inconnu, le procédé de Fuld et le procédé anglais sont plus précis. Mais, le procédé de Bailly, moins complexe et très rapide, est bien suffisamment précis pour déterminer le titre d'une pepsine commerciale.

TROISIÈME PARTIE

CHAPITRE PREMIER

SORTES COMMERCIALES DE PEPSINE

Avant d'examiner les différentes sortes commerciales de la pepsine, il est bon de rappeler pour mémoire comment se prépare la pepsine.

On peut classer les méthodes de préparation sous trois types:

1° Méthodes par autodigestion des muqueuses et concentration: procédé de Petit (1), procédé *anglais*.

2° Méthodes par autodigestion et entraînement ou précipitation du ferment:

Procédé de Brucke (2).
— de Sundberg (3).
— de Kühne.
— de Von Wittich.
— de Schrumpf.

3° Méthodes séparant la pepsine soit des liquides d'au-

(1) Petit (A.). Etudes sur la pepsine. Paris, 1881.

(2) Brucke. Vorlesungen uber Physiologie, I, 294, 1874.

(3) Sundberg. Beitrag zur Kenntniss des Pepsins. *Z. Ph. Ch.*, IX, 319, 1885.

todigestion de muqueuses soit du suc gastrique par des procédés physiques (refroidissement, dialyse).

Méthode de Pekelharing (1).

— de Nencki et Sieber (2).

Procédé industriel. — Le procédé industriel actuellement employé en France, consiste à passer les muqueuses au laminoir, puis à les mettre à digérer :

50 kilos de muqueuses,
1 kilo d'HCl.
60 litres d'eau distillée.

On chauffe à 45° pendant six heures en agitant. Après refroidissement, on siphone le liquide surnageant, on filtre. Ce filtrat est évaporé sur des cuvettes en porcelaine au bain-marie à 40°-44°.

100 kilos de muqueuses donnent environ 18 kilos de pepsine.

De nombreux échantillons d'extraits pâteux titrés par nous en sortant des cuvettes, donnaient :

20 échantillons, le T 300
10 — le T 250
5 — le T 200
2 — le T 200 (faible)

Aujourd'hui le marché français ne fournissant pas assez d'organes, on importe surtout d'Amérique des organes frigorifiés.

La préparation est un peu plus compliquée ; il faut

---

(1) Pekelharing. Mittheilungen uber Pepsin. *Z. Ph. Ch.*, XXXV, 8, 1902.

(2) Nencki et Sieber. Beitrage zur Kenntniss des Magensaftes und der Chemischen Zusammensetzung der Enzyme. *Z. Ph. Ch.*, XXXII, 290, 1901.

dégourdir les muqueuses dans l'eau à 40° avant de commencer l'autodigestion; le dépôt se forme moins bien, la liqueur surnageant est plus trouble. Les envois peuvent varier de qualité; quelquefois, les organes n'ayant pas été soumis au froid immédiatement ont subi un commencement d'autolyse.

Dans la plupart des cas, la pepsine extraite arrive à titrer comme celle des organes frais:

10	échantillons,	T 300
5	—	T 250
5	—	T 200
3	—	T 200 (faible)

Cette pâte en sortant des cuvettes est séchée à l'étuve à 40° dans le vide, titrée à nouveau; puis, on part du titre obtenu pour la ramener aux sortes commerciales.

Le Codex français a inscrit deux sortes de pepsine:

La *pepsine lactosée: titre* 100, c'est-à-dire que 0,10 de cette pepsine doit digérer 10 gr. de fibrine essorée, en six heures, à la température de 50°.

La *pepsine amylacée: titre* 40.

Cette dernière n'a pas sa raison d'être, le titre 100 est même insuffisant et les pharmacopées étrangères emploient des pepsines beaucoup plus actives; nous en avons fait de nombreux titrages, voici les chiffres les plus habituellement trouvés:

Echantillons	Titre français	Titre étranger
Pepsine allemande	200	
Pepsine belge	150 à 180	
Pepsine américaine	450	
Armour's Standard Pepsin U S P soluble Powder..	350	3000 U S P

Echantillons	Titre français	Titre étranger
Armour's Standard (Double B P 1914) Scale.....	550	5000 U S P
Pepsine poudre Mursch et C°.	300	
Pepsine Scale Packe Davis....	300	
Pepsine Scale Stearms et C°..	280	

Parmi les autres modes de présentation trouvés dans le commerce, on peut citer:

La *pepsine paillettes:* la dissolution de pepsine est étendue au pinceau sur des plaques de verre ou mise à évaporer en très faible épaisseur. Cette sorte n'est pas à recommander comme le dit P. Byla, car le grattage peut enlever des parcelles de verre impossibles à déceler au milieu des paillettes.

La *pepsine pâte* (qui ne s'emploie presque plus) était un mélange de pepsine et de gélatine.

La *pepsine fluide* est une sorte très employée et très pratique pour préparer les élixirs, les sirops, etc. C'est une solution aqueuse de pepsine, fortement glycérinée.

Malheureusement, elle n'est pas stable et laisse déposer de la tyrosine. Dans ce milieu liquide, il s'opère un travail sur les impuretés accompagnant la pepsine; ce travail est dû soit peut-être à la pepsine elle-même, soit plutôt à des traces d'érepsine.

Bien des moyens ont été essayés pour empêcher ce dépôt. Quelques-uns se sont montrés efficaces, mais ils altèrent malheureusement l'activité fermentaire de la pepsine.

Voici les résultats que nous avons obtenus par addition d'acide chlorhydrique.

ÉCHANTILLONS DE PEPSINE	HCl GAZEUSE 0/00	TITRES 40	50	70
Témoin contenant abondant dépôt	0	bon	bon	louche
dépôt assez abondant	2,5	bon	bon	mauvais
2 sans dépôt	5	louche	mauvais	mauvais
3 sans dépôt	7,5	mauvais	mauvais	mauvais

Ce lot de pepsine a été fabriqué et titré le 19 juillet 1921; l'essai donné dans le tableau ci-dessus a été fait après un mois.

Comme on le voit, l'acide chlorhydrique empêche bien le dépôt, mais altère la pepsine.

Nous avons essayé différents autres corps; quelques-uns retardent la formation du dépôt, mais aucun ne l'empêche.

Selon nous, la pepsine amylacée du Codex français devrait être supprimée, son titre est absolument insuffisant. Le titre 100 pourrait avantageusement être augmenté à 150 ou 250; les titres trop élevés (300, 500), sont très hygroscopiques et difficiles à peser. Ces pepsines poudres sont les meilleures sortes commerciales et dans des flacons à bouchon de chaux, elles peuvent se conserver indéfiniment.

Les pepsines paillettes peuvent réceler des parcelles de verre; les pepsines fluides déposent rapidement de la tyrosine et deviennent inutilisables; elles sont très pratiques cependant pour les pharmaciens qui font beaucoup de préparations liquides de pepsine.

CHAPITRE II

QUELQUES INCOMPATIBILITÉS DE LA PEPSINE

Certains thérapeutes ont été jusqu'à mettre en doute l'action de la pepsine. Ces échecs apparents peuvent s'expliquer de différentes façons.

D'abord, selon l'opinion de Linossier, les doses administrées sont souvent insuffisantes. Il faudrait ordonner de 1 à 2 grammes par jour de pepsine T 100 pour que vraiment l'effet puisse se faire sentir.

De plus, on a souvent méconnu les conditions spéciales et précises, indispensables au ferment pour conserver son intégrité et à la digestion pour suivre sa marche régulière.

On lui adjoint, en effet, des corps incompatibles: alcalins, par exemple. Comme nous le disions au début de ce travail, la pepsine est un colloïde électropositif; or, toute action où tout système enlevant la couche ionique des micelles entraîne leur floculation en dehors du courant électrique: la pepsine floculera en présence de colloïdes de signe contraire, d'électrons riches eux-mêmes en ions OH ou H — chaleur, etc.

En outre, il est une propriété des solvants ou des milieux de digestion qui influe beaucoup sur les diastases, c'est la viscosité. Ce facteur peut influencer la rapidité du mouvement moléculaire et par cela même, du mouvement brownien.

Les solutions colloïdales sont des pseudo-solutions, sorte de suspension des granules dans un milieu, or si ce milieu n'est pas suffisamment visqueux, le colloïde floculе; de même, un oiseau ne pourrait pas se tenir dans un air trop raréfié ou dans un gaz trop léger.

Pour la distase en action, il est aussi une viscosité optima, laissant libre jeu à la rapidité du mouvement moléculaire et du mouvement brownien: la formule d'Einstein ayant trait à ce dernier phénomène tient compte du coefficient de viscosité.

Beaucoup d'expérimentateurs ont étudié l'action des composés minéraux sur la pepsine. Citons, en particulier, Schütz (1) et Levites, ceux-ci ont remarque que l'action empêchante était due surtout aux anions: SO^4 par exemple, dans les sulfates.

Pincussohn (2) a expérimenté l'action des colloïdes ; l'action empêchante était surtout marquée pour le sesquioxyde de fer et pour les métaux colloïdaux préparés par d'autres voies que la voie électrique.

L'action des composés organiques a donné lieu aussi à un très grand nombre d'essais. Nous nous bornerons à étudier méthodiquement l'action du *chloroforme*, de l'*alcool* et du *tanin*.

Nous verrons:

1° L'action du chloroforme pur, de l'alcool à 95° et du tanin sur la pepsine elle-même;

---

(1) Schutz (J.). Ueber die Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze. *Hofm. Beitr.*, V, 406, 1904.

(2) Pincussohn. Beeinflussung von Fermenten durch Kolloïde Wirkung von anorganischen Kolloïden auf Pepsin. *Bioch. Zeitschr.*, VIII, 387, 1908.

2° L'action des vapeurs de chloroforme sur la pepsine;

3° L'action de l'eau chloroformée et des alcools faibles sur la pepsine;

4° L'action de l'eau chloroformée, de l'alcool et du tanin sur la digestion pepsique *in vitro*.

Action du chloroforme sur la pepsine. — Il est souvent d'usage d'employer le chloroforme dans les préparations ou dans les digestions artificielles, soit comme agent conservateur soit à cause de sa valeur thérapeutique.

Nous avons voulu voir quelle action pouvait exercer le chloroforme sur l'activité diastasique de la pepsine. (Nous avons publié, avec M. le professeur Astruc, une note à ce sujet dans le *Journal de Pharmacie et de Chimie*.)

Javillier résume ainsi les travaux de Bertels (1) et de Dubs (2) : « Le chloroforme n'est défavorable à la digestion pepsique qu'à doses élevées; à petites doses, il serait favorisant ».

Achalme cite simplement cette opinion de Kauffmann « le chloroforme serait nuisible à digestion pepsique ».

Effront (3) indique le chloroforme comme antiseptique dans les digestions artificielles, et Van De Velde, dit-il, propose dans ce but une solution de 10 % de chloroforme dans l'acétone qu'il emploie à raison de 100 gr. par litre de liquide à digérer.

1° *Action du chloroforme pur sur la pepsine.* — Pour expérimenter l'action du chloroforme *pur* sur la pepsine,

---

(1) Bertels. Ueber den Einfluss der Chloroforms auf die Pepsinverdauung. *Virch. Arch.*, CXXX, 497, 1892.

(2) Dubs. Der Einfluss der Chloroforms und die Künstliche Pepsinverdauung. *Virch Arch.*, CXXXIV, 519, 1899.

(3) Déjà cité.

a) Nous avons mis en contact, *pendant six heures,* un gramme de pepsine (T 100 exactement vérifié) avec la quantité de chloroforme nécessaire pour bien l'imprégner. Après ce temps, nous laissons évaporer le chloroforme et avec 50 cc. d'eau distillée, nous faisons une solution de cette pepsine dont nous allons examiner l'activité.

Suivant le procédé du Codex français, nous avons mis au bain-marie à 50°, un flacon contenant 2 gr. 50 de fibrine sèche, 53 gr. 50 d'eau distillée, 1 cc. 50 d'HCl dilué; puis, la température du flacon étant égale à celle du bain-marie, nous avons ajouté 5 cc. 3 de solution de pepsine = 0,10 de pepsine.

Après six heures de digestion, l'épreuve azotique ne nous a donné aucun trouble. La pepsine avait donc bien gardé son titre 100.

b) L'expérience a été renouvelée sur une pepsine « Standard » T 500, mais cette fois les 10 centigrammes de pepsine ont été laissés *quatre jours* en contact avec le chloroforme.

Ensuite, cette pepsine a été dosée par le procédé Codex. L'épreuve azotique après six heures de digestion ne nous a donné aucun trouble.

La même pepsine a été, en outre, essayée à l'édestine (méthode Fuld-Levison, modifiée par Bailly). Nous avons fait:

1° Une solution des 10 centigrammes de pepsine T 500 (soumise quatre jours à l'action du chloroforme pur) dans 50 cc. d'eau distillée;

2° Une solution de 0,50 d'édestine dans 100 cc. d'eau distillée à 2,5 ‰ d'HCl;

3° Une solution témoin de pepsine T 500 (la même que celle ayant subi l'action du chloroforme).

Nous avons mis 20 cc. de solution d'édestine dans deux tubes 1 et 2. Les deux tubes sont placés au bain-marie à 50° et lorsqu'ils en ont pris la température, on ajoute dans le tube 1, 2 cc. de la solution de pepsine n° 1; dans le tube n° 2, on met 2 cc. de la solution de pepsine n° 3.

Les tubes n° 1 et 2 sont laissés au bain-marie, un quart d'heure exactement noté, on les plonge alors dans l'eau à 17° et on ajoute dans chacun XXX gouttes d'AzO^3H.

Le tube n° 1 a donné l'anneau après une demi minute, cet anneau mesurait 1 cc. 4 après un quart d'heure.

Dans le tube n° 2, l'anneau est apparu après une minute et au bout d'un quart d'heure, il mesurait 1 centimètre de hauteur.

	APPARITION DE L'ANNEAU	HAUTEUR
TUBE 1		
Pepsine ayant subi l'action du chloroforme	1/2 minute	1cm.4
TUBE 2		
Témoin	1 minute	1cm.

c) Nous avons alors prolongé le contact du chloroforme pur et de la pepsine T 100 *pendant dix jours.*

Nous obtenons les résultats suivants par le dosage à l'édestine:

ESSAI AU T 100	APPARITION DE L'ANNEAU	HAUTEUR
Tube 1		
Pepsine ayant subi l'action du chloroforme	1/4 de minute	2 cm.
Tube 2		
Témoin	1 minute	1 cm.

ESSAI AU T 80

L'essai au T 80 a donné un anneau insignifiant.

On peut dire cette pepsine faible à 100, bonne à T 90, excellente au T 80.

Comme on le voit, la perte d'activité d'une pepsine est presque insignifiante, même après dix jours de contact avec le chloroforme pur.

2° *Action des vapeurs de chloroforme sur la pepsine.* — Le chloroforme pur n'ayant qu'une très faible action sur la pepsine, il était à supposer que le pouvoir destructeur de ses vapeurs sur la même diastase serait assez insignifiant.

De la pepsine à T 100 a été laissée pendant quatre jours dans un flacon au bouchon duquel nous avions adapté une tige de fil de fer garnie d'un tampon de coton hydrophile imprégné de chloroforme.

Nous avons alors vérifié son titre par quatre essais du Codex français. Dans les quatre expériences, ce titre a été trouvé égal à 100.

3° *Action de l'eau chloroformée sur la pepsine.* — Les médecins ordonnent souvent des solutions de pepsine dans l'eau chloroformée, la pepsine aidant la digestion et l'eau chloroformée agissant sur l'élément douleur. Il était bon de se rendre compte si de telles solutions avaient chance de se conserver un certain temps.

Une solution de 2 gr. de pepsine T 100 a été faite par nous le 17 septembre et dosée ce même jour (elle a été trouvée bonne au T 100).

Le titrage a été renouvelé le 22 septembre et le 1er octobre; il a fourni encore un chiffre semblable au précédent T 100. Le 16 novembre, nouvel essai: l'activité a, cette fois, un peu faibli, on peut l'indiquer égale au T 80.

Thibault (1) avait remarqué que l'eau chloroformée était un bon solvant de la pepsine et que ces solutions

(1) Thibault. Thèse déjà citée, p. 61.

pouvaient se conserver quelquefois jusqu'à six mois sans altération sensible. Nos expériences semblent confirmer déjà une légère altération de l'activité fermentaire de la pepsine déjà après deux mois de conservation dans l'eau chloroformée.

4° *Action de l'eau chloroformée sur la digestion in vitro.* — Il convenait enfin de déterminer quelle pouvait être l'action de l'eau chloroformée comme milieu digestif *in vitro*. Pour cela, dans le procédé de dosage de la pepsine du Codex français, nous avons remplacé les 58 gr. 50 d'eau distillée par la même quantité d'eau chloroformée.

Nous avons fait trois essais avec une pepsine T 100 en présence de flacons témoins contenant de l'eau distillée au lieu d'eau chloroformée.

Un nouvel essai a été réalisé en outre avec une pepsine T 500.

Voici résumés, dans les tableaux suivants, les résultats obtenus :

PEPSINE EMPLOYÉE T 100	ESSAI AU T 100	ESSAI AU T 50
1er Essai	mauvais	léger louche
2me Essai	mauvais	léger louche
Témoin	bon	bon

PEPSINE EMPLOYÉE T 500	ESSAI AU T 500	ESSAI SORENSEN ACIDES ANIMÉS
1er Essai	mauvais	3cc.6 NaOH N/10
Témoin	bon	4cc.2 NaOH N/10

Les résultats par le dosage à l'édestine sont encore plus clairs.

Nous avons fait :

1° Une solution de 1 gr. de pepsine T 100 dans 100 cc. d'eau distillée ;

2° Une solution de 0 gr. 50 d'édestine dans 100 cc. d'eau chloroformée à 2,5 ‰ d'HCl;

3° Une solution de 0,50 d'édestine dans 100 cc. d'eau distillée à 2,5 ‰ d'HCl.

Nous avons mis dans deux tubes 20 cc. de solution d'édestine dans l'eau *chloroformée* chlorhydrique: tubes 1 et 2; dans deux autres tubes, 20 cc. de solution d'édestine à l'eau *distillée* chlorhydrique (tubes 3 et 4).

Les quatre tubes sont placés au bain-marie à 50°. Lorsqu'ils en ont pris la température, on ajoute 2 cc. de solution de pepsine = 0,02 de pepsine.

Le tube 1 et le tube 3 sont laissés un quart d'heure exactement noté, on les plonge dans l'eau à 17° et on ajoute dans chacun XXX gouttes d'AzO^3H.

On note l'apparition de l'anneau et sa hauteur après un quart d'heure.

Après un quart d'heure de digestion à 50°

1er ESSAI	ESSAI AU T 100	APPARITION ET HAUTEUR DE L'ANNEAU
Tube 1	mauvais	immédiat, 3cm.3 après 1/4 d'heure
Tube 3	bon	1/2 minute, 1cm. après 1/4 d'heure

Les tubes 2 et 4 ont été laissés 21 minutes au bain-marie. (Ce temps est le terme de digestion d'une pepsine T 80.)

Après 20 *minutes à* 50°

2me ESSAI	ESSAI AU T 80	APPARITION ET HAUTEUR DE L'ANNEAU
Tube 2	médiocre	1/4 de minute, 1cm.2 après 1/4 d'heure
Tube 4	très bon	pas d'anneau

La concordance des résultats de ces expériences montre clairement le pouvoir retardateur de l'eau chloroformée comme milieu de digestion *in vitro*..

Mais nous disons *in vitro,* car l'estomac est un organe vivant qui s'empresse de rétablir l'équilibre, à moins d'être malade et surchargé. Il n'est donc pas possible de déduire de nos expériences que physiologiquement l'eau chloroformée s'oppose d'une manière appréciable, soit à la digestion stomacale, soit même à l'activité de la pepsine introduite en même temps dans l'organisme.

D'ailleurs l'eau chloroformée n'est employée qu'en très petite quantité par rapport à la capacité stomacale, si bien que sa valeur d'anesthésique doit l'emporter de beaucoup sur son pouvoir retardateur.

De ces expériences, on peut tirer les conclusions suivantes.

Le chloroforme pur possède une influence destructive fort lente sur l'activité diastasique de la pepsine; ses vapeurs sont sans action.

L'eau chloroformée est un bon solvant de la pepsine, et peut très bien lui être associée dans des préparations devant être absorbées en peu de jours.

Mais, cette eau chloroformée est un mauvais milieu, de *digestion in vitro,* car elle change les propriétés de l'eau pure, milieu optimum.

Action de l'alcool sur l'activité pepsique. — L'action de l'alcool sur l'activité fermentaire de la pepsine a donné lieu à de nombreuses controverses.

D'après A. Petit (1), une solution de pepsine à 20 % d'alcool conserve entièrement ses propriétés digestives. M. Chassaing (2) trouve qu'une pepsine (de titre 80), con-

(1) Petit. *Loco citato.*

(2) Chassaing. Etude pratique de la pepsine. Thèse pharm., Paris, 1887.

serve son activité dans de l'alcool à 20° après six mois de contact.

M. Bardet (1) trouve que l'altération de la pepsine ne débute que dans un milieu à 25 % d'alcool, tandis que M. Thibault reconnaît déjà sensible l'altération dans les milieux à 12,5 % et très forte dans ceux à 20 %.

Des résultats aussi discordants sont dus à ce que les auteurs n'ont pas tenu un compte assez précis des facteurs en jeu et se sont servis de procédés différents pour mesurer l'activité fermentaire.

D'après Portes, il y aurait aussi lieu de tenir compte de la plus ou moins grande solubilité de certaines pepsines, ce serait une cause de la non concordance de certains résultats.

Tous les auteurs s'entendent cependant pour attribuer à l'alcool une certaine atténuation de l'activité pepsique, mais ils ne s'accordent point sur le temps de contact, le titre de l'alcool.

Nous avons essayé de reprendre certains points de cette question en les étudiant avec méthode.

1° *Action de l'alcool à 95° sur la pepsine.* — A. Nous avons mis d'abord en contact 1 gr. de pepsine T 100 avec de l'alcool à 95° en quantité suffisante pour bien l'imprégner. Après *quatre jours,* on laisse évaporer l'alcool et, avec 50 cc. d'eau distillée, on fait une solution de la pepsine afin de la titrer.

a) *Par le procédé à l'édestine:*

1 cc. de la solution de pepsine T 100 = 0,02 de pepsine.
20 cc. de solution chlorhydrique d'édestine.

---

(1) Bardet. *Bull. de la Société de thérapeutique,* 2e s., XIV, 98, 1887.

Après un quart d'heure de digestion à 50°, l'addition de XXX gouttes d'AzO^3H au digestat, nous a donné l'anneau au bout d'un quart de minute et cet anneau mesurait 1 cc. 3 après un quart d'heure.

La pepsine avait donc gardé son titre, le tube témoin nous donnant le même anneau.

b) *Par le procédé à la fibrine:*

Nous avons fait deux essais, l'un au T 100, l'autre au T 50.

Epreuve azotique: négative aux deux titres.

Dosage de Sôrensen:

Essai au titre 100: poids d'azote 0,029
Essai au titre 50: poids d'azote 0,031

B. Une nouvelle quantité de pepsine T 100 (1 gr.) est mise en contact pendant *dix jours* avec l'alcool à 95°. Au bout de ce temps, on laisse l'alcool s'évaporer, on met en solution et on fait le titrage.

Le dosage de l'édestine a donné au

T 100: un précipité abondant.
T 80: un précipité abondant.
T 50: un précipité.
T 40: médiocre.
T 30: bonne.

Comme on le voit, l'alcool à 95° est rapidement destructeur de l'activité diastasique; en effet, après dix jours, la pepsine a perdu presque complètement toute sa valeur.

Pour bien juger l'action de l'alcool sur la pepsine, il faut (après un temps de contact déterminé), l'*évaporer*, car ainsi il n'agit plus ni sur la solution, ni sur le milieu digestif.

Nous insistons sur ce point; en effet, il nous est arrivé au début de cette étude sur l'action de l'alcool, d'avoir trouvé une pepsine mauvaise aussitôt la solution faite dans l'alcool à 60°: la pepsine se dissolvant très mal dans un alcool aussi fort et cet alcool ayant agit sans doute sur le milieu digestif.

Si nous nous étions borné à cette expérience, nous aurions conclu que l'alcool à 60° était *immédiatement* destructeur de l'activité diastasique.

2° *Action des alcools faibles sur la pepsine.* — Nous avons fait ensuite des essais avec des alcools plus faibles. L'alcool à 15° a une certaine importance, car c'est le degré correspondant au vin de liqueur.

Dans un alcool à 15° deux solutions de pepsine T 500 ont été faites le 3 octobre, titrées le jour même et trouvées bonnes au T 500. Titrées à nouveau, le 6 novembre, la pepsine est descendue au T 400; le 29 novembre, elle ne donne plus que le titre 350.

Les vins et les élixirs sont de bien meilleurs solvants que l'alcool pur même à titre alcoolique égal; leur viscosité est bien plus favorable à la pepsine.

Un élixir de pepsine Byla contenant 5 gr. de pepsine, 45 gr. de sirop de sucre, 30 gr. d'alcool de Chartreuse, 20 grammes d'eau distillée, n'a manifesté aucun affaiblissement de titre après six mois.

Au contraire, une préparation d'une autre provenance contenant environ 1 % d'acide chlorhydrique officinal et des teintures de quinquina et de coca s'est montrée absolument inactive après six mois. L'activité fermentaire s'était altérée sans doute au contact d'HCl (nous avons vu l'action néfaste de l'HCl à propos des pepsines fluides). Nous avons fait des solutions de pepsine dans des

vins de Malaga purs ou mélangés à de la glycérine ou du sirop de sucre; le titre des pepsines s'y conserve bien.

3° *Action des alcoools faibles sur la digestion in vitro.* — Dans ces essais d'élixir, de vins, il y a lieu de tenir compte du retard apporté dans la digestion *in vitro* par l'addition d'alcool ou de tout liquide changeant la viscoisté du milieu de digestion.

Thibault avait signalé qu'environ 20 gr. d'élixir rendaient impossible la digestion dans le temps normal. Nous avons voulu vérifier cette action retardatrice *in vitro*. Pour ce, dans la solution d'édestine, nous avons remplacé l'eau distillée par de l'eau alcoolisée à 8 % d'alcool; 20 cc. sont mis dans un tube au bain-marie à 50°, on ajoute 0,02 de pepsine T 100. Après un quart d'heure de digestion, l'AzO^3H nous a donné un *précipité abondant.*

Le témoin ne donnait l'anneau qu'après une demi minute et la hauteur de cet anneau était de 1 cc. 7.

Des solutions d'édestine contenant 5 %, 2,5 % d'alcool ont donné des retards considérables de digestion.

De ces expériences *in vitro,* il ne faudrait pas conclure que toute prise d'alcool soit nuisible à un estomac bien constitué. Sans nul doute, l'homme est fait pour boire de l'eau, mais, de temps à autre, un verre de bon vin engendre la gaieté et crée un bien être qui n'indique en rien une action nocive. Par contre, l'effet nuisible d'un excès d'alcool est connu de tous. Qui n'a vu les matières vomies par un ivrogne après un repas arrosé de trois à quatre litres de vin rouge? On pourrait y compter sans difficulté les bouchées avalées. L'excès de matières tanniques et l'alcool ont arrêté complètement la digestion.

Des résultats obtenus, on peut déduire que l'alcool à 95° est un destructeur rapide de l'activité fermentaire. Ce pouvoir destructif diminue avec le titre alcoolique et cette altération est d'autant moins marquée que l'alcool est mélangé de sirop ou de glycérine.

Mais l'alcool changeant la viscosité du liquide même à des concentrations de 2,5 %, a un pouvoir retardateur très accentué dans les digestions *in vitro*.

Action du tannin. — L'action du tannin sur l'activité pepsique a été peu étudiée. « C'est un retardateur » disent quelques auteurs. Pourtant, le tannin a une grande importance, non qu'il soit employé souvent à l'état pur, mais il existe dans les vins, les sirops associés à la pepsine.

Le tannin est très difficile à étudier, car il précipite les albuminoïdes et les peptones en solution acide: il suffit d'ajouter une solution concentrée de tannin à du digestat de fibrine ne troublant plus par l'AzO^3H, pour qu'immédiatement il se forme un abondant précipité. De plus, le dosage de Sôrensen est impossible, car, le NaOH donne un coagulum noir avec le tannin.

Action du tannin sur la pepsine. — Nous avons essayé l'action du tannin pur sur la pepsine. Pour ce, nous nous sommes servis d'une pepsine de très haut titre (T 500) dont nous avons mis 0 gr. 50 en présence de 0 gr. 10 de tannin à l'alcool et de q. s. d'eau, soit 10 à 15 cc. environ. Après huit jours de contact, nous avons préparé un flacon (procédé Codex) et nous avons mis 1 cc. de la solution pepsine-tannin amené à 100 cc. (1 cc. = 0,02 cc. pepsine T 500). La quantité de tannin ajoutée à la digestion est ainsi insignifiante; aussi nous pouvons juger de l'action du tannin sur la pepsine.

Après six heures de digestion au bain-marie à 50°, l'AzO^3H n'a donné aucun trouble; la pepsine avait bien gardé son titre 500.

Thibault (1) signale comme destructif (à cause du tannin), au bout de 22 jours, le mélange suivant:

Pepsine (200)	2 gr. 50
Eau chloroformée	350 gr.
Sirop de cerises.....	150 gr.

Nous avons renouvelé cette préparation:

Pepsine T 500.....	0 gr. 05
Eau chloroformée	40 gr.
Sirop de cerises.....	10 gr.

Ce mélange a été fabriqué le 5 novembre; le titre le 17 novembre avait baissé à 450; il était le même le 21 novembre et le 16 décembre La pepsine a donc perdu très peu de son titre dans ce mélange après un mois et dix jours. Les conclusions de Thibault étaient exagérées.

Action du tannin sur la digestion in vitro. — L'action du tannin dans le milieu digestif *in vitro* semble bien être retardatrice; mais il est difficile d'en faire la preuve.

Par exemple, nous avons remplacé l'eau distillée du Codex par une solution de tannin à 1 %, nous avons eu des précipités abondants après six heures, six heures et demie et sept heures, mais ce trouble était peut-être dû à l'actionn du tannin en milieu azotique sur les peptones; en effet, du digestat qui ne trouble pas par AzO^3H se met à précipiter abondamment si on ajoute une solution concentrée de tannin.

Nous avons essayé des digestions en milieu vin rouge.

(1) Thibault. Déjà cité.

Après six heures, nous mettions dans un tube 5 cc. du digestat filtré et 5 cc. d'eau distillée, ce liquide traité par l'acide azotique, nous donnait un précipité abondant. Dans un autre tube, nous mélangions 5 cc. de digestat ne troublant plus par AzO^3H et nous ajoutions 5 cc. de vin rouge; l'AzO^3H nous donnait alors un précipité dû au tannin du vin rouge, mais ce précipité était moins abondant que le précédent. Cette comparaison démontre que, dans le premier tube, une partie du précipité était due au tannin, l'autre à un retard de digestion.

Le tannin, sans être un destructeur, semble, d'après les expériences faites, affaiblir l'activité diastasique et nuire à la digestion *in vitro*. Les conclusions ne peuvent pas être très nettes, car il est possible de confondre son rôle retardateur sur la digestion et son pouvoir précipitant sur les produits de la digestion.

CONCLUSIONS

Dans une première partie, nous avons résumé les données scientifiques ayant trait à la pepsine et aux albuminoïdes. Trois propriétés intéressantes du colloïde nous ont arrêtés surtout: l'*adsorption,* la *cataphorèse* et la *floculation,* car elles expliquent le mode d'action et les incompatiblités du ferment.

Les méthodes de dosage de l'activité de la pepsine ont fait l'objet d'une deuxième partie.

La méthode du Codex est assez précise pour apprécier le titre d'une pepsine commerciale et elle est bien supérieure aux procédés des pharmacopées étrangères. Certains points de technique cependant ne sont pas assez détaillés (homogénéisation, agitation des flacons, etc.). Le procédé serait devenu parfait, si nous étions arrivés à stabiliser la fibrine. Jusqu'à solution de la question, nous donnons la préférence à la fibrine fraîche, essorée à fond et à la fibrine desséchée aux environs de 0°; car l'autolyse peut y être considérée comme négligeable.

Les procédés des pharmacopées étrangères sont vraiment trop imparfaits. Nos expériences montrent en effet qu'il peut y avoir: erreur sur la quantité de matière à digérer due à la rapide dessiccation du blanc d'œuf, erreur provenant de la plus ou moins fine division et de la

plus ou moins bonne homogénéisation, erreur sur la valeur d'une pepsine peptonisant bien et dissolvant mal.

Ces erreurs ne sont point à craindre avec le blanc d'œuf desséché que nous avons employé. Il est à souhaiter que les pharmacopées étrangères précisent leur technique, ou bien remplacent le blanc d'œuf frais par le blanc d'œuf desséché.

Le dosage à l'édestine semble en faveur en Amérique; il ne serait pas étonnant qu'il supplantât le procédé actuel à l'ovalbumine.

Ce procédé à l'édestine est le plus précis. La méthode de Fuld et la méthode américaine sont assez compliquées, mais elles donnent des résultats très justes. La modification de Bailly a une technique plus simple; elle est suffisante pour apprécier des pepsines commerciales et sa grande qualité est d'être très rapide.

Dans une troisième partie, nous avons rappelé brièvement le procédé de fabrication industrielle de la pepsine et ses sortes commerciales.

La préférence doit être donnée à la pepsine en poudre qui, dans des flacons bien bouchés, se conserve indéfiniment.

Le Codex ferait bien d'augmenter le titre de la pepsine jusqu'à 150 ou 200; l'inconvénient des poudres à titre très élevé (300, 500) est de prendre aussitôt l'humidité. La pepsine amylacée T 40 n'a pas sa raison d'être.

Nous avons étudié ensuite l'action de trois corps (chloroforme, alcool, tannin) indiqués comme incompatibles avec la pepsine et nous sommes arrivés aux conclusions suivantes:

Le chloroforme pur a une action destructive lente sur l'activité de la pepsine.

L'alcool à 95° a une action destructive rapide sur la pepsine (dix jours environ).

Le tannin a une action nuisible, mais assez difficile à déterminer.

L'eau chloroformée et l'alcool faible mélangé de sirop ou de glycérine sont de bons solvants de la pepsine. Elle peut s'y conserver longtemps.

L'eau chloroformée et l'alcool faible sont de très mauvais milieux de digestion *in vitro*.

BIBLIOGRAPHIE

Achalme (P.). — Electronique et biologie, 1913.

Arthus. — L'enzyme propriété. Thèse de médecine, Paris, 1896.

— La Physiologie, 1921. Masson, édit.

Astruc. — Traité de pharmacie galénique, 1921. Maloine, édit.

Bardet. — *Bulletin de la Soc. de thérapeutiq.*, 2e s., 1887.

Bayliss. — *Biochem. Journ.*, t. I.

Bernard (Claude). — Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux végétaux, 1878.

Bertels. — Ueber dem Einfluss der Chloroforms aus die Pepsiverdanung. *Virch. Arch.*, CXXX, 497, 1892.

Brancaz. — Contribution à l'étude du titrage de la pepsine pharmaceutique. Thèse de Lyon, 1906.

Brucke. — Vorlesungen über Physiologie, I, 1874.

Byla (P.). — Les produits biologiques médicinaux, 1904.

Carracido (José). — Phylogénie chimique de la molécule albuminoïde. *Revue scientifique*, 11 déc. 1920.

Chassaing. — Etude pratique de la pepsine. Thèse Paris, 1887.

Choay. — Des extraits opothérapiques. Thèse, 1911.

Denigès. — Cours de chimie biologique.

Dubs. — Der Einfluss der Chloroforms und die Künstlishe Pepsinverdauung. *Virch. Arch.* CXXXIV, 1899.

Duclaux. — Microbiologie.

Effront. — Les catalyseurs biochimiques, 1914. Dunod et Pinat, édit.

Ernst. — Ueber die Catalyse des Knallgazes durch Kolloïdales Platin. *Zeit. J. Physik Chem.*, 1901, t. 37.

Fouillouze. — Influence de certains médicaments hypnotiques sur les phénomènes chimiques de la digestion. Thèse de Lyon, 1920.

Fuld et Levison. — Die Pepsinbestimmung mittelst der Edestin probe. *Bioch. Zeitschr.*, VI, 1907.

Fischer. — Untersuchungen über Aminosaüren, Polypeptide und Protéine. *Julius Springer*, Berlin.

Fischer et Niebel. — Ueber der Verhalten der Polysaccharide gegen einige tierishe Secrete and organe 1896.

Glassner. — Ueber die Vorstufen der Magenfermente. *Hofm. Beitr.*, t. I, 1901.

Grumbach. — Thèse Faculté des sciences, Paris, 1911.

Hawk (Philip). — Practical Phyciological Chemis., 1919.

Javillier (M.). — Des ferments protéolytiques. Thèse d'agrégation, 1909.

Knecht. — Ber. d. deutsch. Chem. Gesell., 1888.

Kossel et Pringle (H.). — Uber Protamine und Histone IV. Uber das Histone. *Z. Ph. Ch.*, XLIX, 1906.

Langley et Edkins. — Pepsin and Pepsinogen. *Z. of Phys.*, VII, 1886.

Langley. — On the histology of the mammaliangastric glands and the relation of pepsin to the granules of the chief cells. *J. of Physiolog.*, III, 1881.

Macquaire. — Titre de la pepsine. *J. Ph. Ch.*, XVI, 1902.

— De l'emploi de la fibrine desséchée et pulvérisée. *J. Ph. Ch.*, XII, 1900.

METT. — Contribution à la physiologie des sécrétions. Diss. en russe, 1889.

NENKI et SIEBER. — Beitrage zur Kenntnis des Magensaftes. *Z. Ph. Ch.*, 1901.

NEUMEISTER. — Bermerh und Chemie der Albumosen und Peptone. *Z. f. Biol., N. F. I.*, 1887.

NIERENSTEIN et SCHIFF. — Ueber die Pepsinbestimmung nach Mett. *Arch. f. Verd. Kr.*, VIII, 1902, d'apr. *Bioch.*, I, 1903.

PERRIN (J.). — *Journal de chimie physique*, t. II, 1904 et t. III, 1905.

PEKELHARING. — Mittheilungen über Pepsin. *Z. Ph. Ch.*, XXXV, 1902.

PETIT (A.). — Etude sur la pepsine, Paris, 1881.

PODWISSOTSKI. — *Plüg. Arch.*, XXXIX, 62.

ROGER et GARNIER. — Influence des variations simultanées de la pepsine et d'HCl sur la digestion peptique. *C. R. Biologie*, LXI, 1906.

SCHUTZ. — Methode bur Bestimmung der relativen Pepsinmengen. *Z. Ph. Ch.*, IX, 1890.

— Ueber die Hemmung der Pepsinwirkung durch Salze. *Hofm. Beitr.*, V, 1904.

SÔRENSEN. — Sur l'albumine du blanc d'œuf. *Bull. de la Société chimique de France*, 20 août 1921.

SUNDBERG. — Beitrag zur Kenntniss des Pepsins. *Z. Ph. Ch.*, XXXV, 1902.

TARBOURIECH. — Cours de chimie biologique.

THIBAULT. — Etude sur les préparations officinales de la pepsine inscrites au Codex 1884. Thèse de Paris, 1902.

Van Bemmelen. — *Zeitschrift f. prakt. Chem. und anorg. Chem. und Physik. Chem.*, 1881, 1900, 1895.

Warren. — *Journal Am. Pharm. Assoc.*, VIII, 1919.

Zunz. — Ueber den quantativen Verlauf der Peptischen Eiweiss-spaltung. *Z. Ph. Ch.*, XXVIII, 1899

Vu et bon d'imprimer.
Montpellier, le 22 décembre 1921.
Le Président de la Thèse,
ASTRUC.

Vu et approuvé.
Montpellier, le 23 décembre 1921.
Le Doyen de la Faculté,
G. MASSOL.

Vu et permis d'imprimer.
Montpellier, le 24 décembre 1921.
Le Recteur,
Jules COULET.